

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**El eje TWEAK/Fn14 como activador de la respuesta  
inflamatoria asociada a la progresión e inestabilidad  
de la lesión aterosclerótica**

**CRISTINA SASTRE REYERO**

**Madrid, 2013**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**El eje TWEAK/Fn14 como activador de la respuesta  
inflamatoria asociada a la progresión e inestabilidad  
de la lesión aterosclerótica**

Memoria que presenta la licenciada en biología Cristina Sastre Reyero para  
optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dr. Luis M. Blanco y Dr. Jesús Egido de los Ríos

Instituto de Investigaciones Sanitarias-Fundación Jiménez Díaz,  
Universidad autónoma de Madrid.





Don Luis Miguel Blanco Colio, investigador adjunto del IIS-FJD y Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

#### CERTIFICAN

Que Doña Cristina Sastre Reyero, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha realizado en el laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo su dirección, la presente tesis doctoral, titulada “El eje TWEAK-Fn14 como activador de la respuesta inflamatoria asociada a la progresión e inestabilidad de la lesión aterosclerótica”.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 8 de Octubre de 2013

Los directores de tesis:

Dr. Luis M. Blanco Colio

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Vº Bueno del tutor:

Dr. Óscar H. Martínez-Costa



## Agradecimientos

En primer lugar quería agradecer al doctor Egido la oportunidad que me brindó al aceptarme en este laboratorio, al doctor Ortiz por ser mi primer jefe y sobre todo a Luis por rescatarme cuando todo apuntaba a que me quedaría vagando sola durante tres años y darme la oportunidad de trabajar en ese magnífico proyecto cuyo resultado es la tesis que tenéis entre manos. Nunca te estaré lo suficientemente agradecida.

A la Fundación Conchita Rábago por financiar mis años de becaria predoctoral y hacer que sólo tuviera que preocuparme de lo importante. Porque sin su apoyo probablemente ahora mismo no estaríais leyendo estos agradecimientos.

A Valva, mi mano derecha, mi compañera de poyata y amiga. Gracias por ayudarme a hacer realidad esta tesis, por esos buenos ratos haciendo “circuitos”, por las risas y las confianzas. Por hacer que el trabajo no parezca trabajo. Sin tu ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

A Julito, por tenderme tu mano siempre que te lo he pedido, por tu infinita paciencia, por tus respuestas para todo y por la lista interminable de favores que me has hecho y que espero algún día poder devolverte. Gracias. Una parte de esta tesis es tuya ;)

A Carmen, la jefa, por ayudarme en todo lo que he necesitado y estar siempre disponible para echar un cable a quién haga falta. A José Luis, por ser el tío más cachondo del laboratorio (en el buen sentido), por saberlo todo y compartir con todos ese conocimiento.

A Laura, la persona con más paciencia del laboratorio. Sin ti seguro que esta tesis no hubiera sido posible, ni esta ni ninguna otra je je je. Por demostrarme que el trabajo de investigación no sale adelante sin una buena administración detrás.

A Juan, mi minijefe, el chico más guapo del laboratorio, por tu sonrisa perenne, por tu adiestramiento, por ayudarme siempre que has podido, por tu simpatía y arte andaluz; muchas gracias. A Loli, por ser como eres, por haberte convertido en amiga y compañera y en definitiva, por estar ahí; a Susana por ser la “mami del laboratorio”, por ocuparte de todo y por saberlo absolutamente todo del labo, ha sido un honor aprender de ti; a Beñat por ser el vasco más campetxano que conozco y sobre todo por ser buena persona y mejor compañero; a Ana por ayudarme “con las cuentas”, por tu buen humor perpetuo y por ser la primera mami heavy que conozco je je je; a Rox y Helena, las proteomic girls, por vuestra amabilidad y simpatía diaria, por animar el laboratorio y ser las personas que más saben de proteómica que conozco (con permiso del doctor Martín Ventura por supuesto :P); a las Beñakas: Carlota y Ainhoa, las vecinas de poyata más divertidas, os deseo lo mejor a las dos sea lo que sea que os depare el mundo investigador; a Alfonso, por traer ese carácter sureño al laboratorio, por tu desparpajo y por coger el relevo de Klotho; a Ío por ser de las personas más amables, discretas y tranquilas que he conocido, por tener la mejor caligrafía de todo el laboratorio y por estar ahí siempre que hace falta; a Conchi, por tu simpatía y cercanía, por contestarme a todas las dudas que se me ocurrían mientras redactaba y maquetaba el manuscrito, muuuuuuchas gracias :\*; a Patri (jo tííííííííííaaa ji ji ji), me lo he pasado supermegaultrabien contigo; a Jonay, por tu simpatía, por acompañarnos a comer todos los días a pesar de ser casi siempre el único chico; a Charly, por sus consejos y respuestas y la receta de aquellas albóndigas al vino tinto hmmmm; a Bego, por ayudarme en todo incluso a 2000 kilómetros

de distancia, te deseo lo mejor en tu vuelta; a Tarín, casi casi te mereces un párrafo para ti solo je je je, muchas gracias por todo, por ser el mejor profe dentro del laboratorio, por compartir tus conocimientos con todos, por hacerme más sabia, más dura y menos inocente y acudir todas las veces que te he llamado.

Quiero también dar las gracias a Bea por enseñarme todas “las manos” que sé, por guiarme y ayudarme en mis primeros pasos como investigadora.

Al resto de la familia del laboratorio, A Irene, a Sandra por su simpatía y estilazo a la hora de vestir, me encanta!, a Raúl, Caro, Raquel, Mati, Olga, Marta, Maca, Pris, Sergio, Morgui, Ernesto, Christian, Carlos, Elisa, Kike, Esther y Luiscar por aportar un poco de cada uno de vosotros y porque sin vosotros el labo no sería el mismo.

Al laboratorio de Esbrit, por ser nuestros dealers de emergencia: Sergio, Adela, Marta, Dani (el tío con la barba más perfecta del 15M) y Ana, por tu sonrisa y simpatía, ánimo que ya queda menos ;).

Al equipo del animalario: Pilar y Juani por su cercanía y a Carlos por alegrarme con sus entretenidas conversaciones los ratos junto a los ratoncitos.

A mis más mejores amigas: Patrissia, Ana (siempre seré tu mapache), Rosa, Clara (o Clàriga je je je) y Esther. Os quiero tanto. Por otros 23 años juntas. Muchísimas gracias por formar parte de mi vida.

A mi familia. Papi y Mami gracias por estar siempre ahí, por ser mis pilares, mi ejemplo a seguir y la roca donde apoyarme. Os quiero mucho. A la Tía Ana por ser la persona que más se ha preocupado de mi carrera investigadora, por ser mi madrina, mi segunda madre. A Silvia, por hacerme sentir un poco menos sola en esta ciudad.

A todos vosotros, gracias.



## MARRIAGE vs. The Ph.D.



Marriage



Ph.D.

Typical Length:

7.5 years

7 years

Begins with:

A proposal

A thesis proposal

Culminates in a ceremony where you walk down an aisle dressed in a gown:



Usually entered into by:

Foolish young people in love

Foolish young people without a job

50% end in:

Bitter divorce

Bitter remorse

Involves exchange of:

Vows

Know-how

Until death do you part?

If you're lucky

If you're lazy



## RESUMEN

Las complicaciones clínicas asociadas a la presencia de placas ateroscleróticas derivan principalmente de la obstrucción luminal ocasionada por el crecimiento de la placa o de su desestabilización y posterior rotura dando lugar a un evento isquémico. El inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK, TNFSF12) es una citoquina proinflamatoria que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral. A través de su receptor funcional Fn14, participa en múltiples procesos celulares tales como la inflamación, proliferación, migración, neoangiogénesis y muerte celular programada o apoptosis.

En la presente tesis hemos analizado el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 durante la progresión y desestabilización de la lesión aterosclerótica mediante dos abordajes experimentales complementarios: la delección génica de TWEAK o el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK en ratones deficientes para el gen ApoE. Así, hemos observado que la delección de TWEAK reduce tanto la carga aterosclerótica como el tamaño de las lesiones presentes en dos territorios vasculares distintos, el seno aórtico y la arteria braquiocefálica. Además, la ausencia de TWEAK provocó un cambio en la composición celular de la placa y disminuyó la respuesta inflamatoria mediada por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y las citoquinas MCP-1, RANTES y HMGB1, la expresión de metaloproteinasas y la presencia de diferentes marcadores de inestabilidad (presencia de xantomas laterales, hemorragia intraplaca, cápsulas enterradas, erosión de la media y calcificación) en las lesiones ateroscleróticas presentes en los ratones deficientes en ApoE. El tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK fue capaz de reproducir el fenotipo genético obtenido en los animales doble deficientes para TWEAK y ApoE.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis indican que TWEAK juega un importante papel durante la progresión e inestabilidad de la lesión aterosclerótica y que el bloqueo de TWEAK podría ser una nueva estrategia terapéutica para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis.



## SUMMARY

Clinical complications associated to atherosclerotic plaques mainly arise from luminal obstruction due to plaque growth or destabilization and subsequent rupture leading to ischemic event. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK, TNFSF12) is a proinflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. Through its functional receptor, Fn14, TWEAK takes part in multiple cellular processes as inflammation, proliferation, migration, neoangiogenesis and programmed cell death or apoptosis.

In this thesis we have analyzed the role that plays TWEAK/Fn14 axis during the progression and destabilization of atherosclerotic plaque by two complementary experimental approaches, genetic deletion of TWEAK or treatment with a blocking antibody anti-TWEAK in ApoE knockout mice. We have observed the TWEAK deletion reduces both atherosclerotic burden and size of lesions located in two distinct vascular territories, aortic root and brachiocephalic artery. In addition, TWEAK deletion caused a change in cellular composition and decreased inflammatory response mediated by activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B and cytokines MCP-1, RANTES and HMGB1, metalloproteases expression and presence of different instability markers (lateral xanthomas, intraplaque hemorrhage, buried caps, medial erosion and calcium content) in atherosclerotic plaques present in ApoE knockout mice. Treatment with a blocking antibody anti-TWEAK was able to reproduce the genetic phenotype obtained in ApoE and TWEAK double knockout mice.

In conclusion, the results of this thesis show that TWEAK plays an important role during the progression and instability of atherosclerotic lesion and blockade of TWEAK could be a new therapeutic strategy for prevention and treatment of atherosclerotic disease.



# ÍNDICE





Clave de abreviaturas	21
I. INTRODUCCIÓN	25
I.1 LA ATEROSCLEROSIS	27
I.1.1 Patogenia de la aterosclerosis	29
I.1.2 Aspectos que afectan a la integridad de la placa	31
I.1.3 Modelo murino de aterosclerosis: el genotipo deficiente en la proteína apolipoproteína E	32
I.1.4 La arteria braquiocefálica	33
I.2 SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	35
I.2.1 TWEAK	37
I.2.2.1 El receptor de TWEAK: Fn14	38
I.2.2.2 Señalización del sistema TWEAK-Fn14	38
I.2.2.3 Papel de TWEAK y Fn14 en la aterosclerosis	39
I.3 NF-Kb	41
I.3.1 Papel de NF- κB en la aterosclerosis	42
I.4 HMGB1	43
I.4.1 Implicación de HMGB1 en la aterosclerosis	45
II. OBJETIVOS	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
III.1 ESTUDIOS EN PACIENTES	53
III.1.1 Obtención de placas ateroscleróticas carotídeas	53
III.1.2 Aislamiento de monocitos humanos	53
III.2 ESTUDIOS IN VITRO	53
III.2.1 Reactivos	53
III.2.2 Líneas celulares	54
III.3 ESTUDIOS IN VIVO	54
III.3.1 Modelo animal I: Generación de ratones dobles deficientes para TWEAK y ApoE	54

III.3.2 Modelo animal II: Inyección sistémica de TWEAK	56
III.4. TÉCNICAS UTILIZADAS	57
III.4.1 Análisis histológicos	57
III.4.1.1 Tinción de aorta completa	57
III. 4.1.2 Análisis morfométrico del seno aórtico y la arteria braquiocefálica	57
III.4.1.3 Análisis inmunohistoquímico	58
III.4.1.3.1 Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas	60
III.4.1.4 SouthWestern	60
III.4.1.5 Zimografía in situ	61
III.4.1.6 Inmunofluorescencia	61
III.4.2 Análisis de ARN: Extracción de ARN y PCR en tiempo real	61
III.4.3 Análisis de proteínas	62
III.4.3.1 Array proteico	62
III.4.3.2 Western blot	63
III.4.3.3 ELISA	63
III.4.4 Transfección con ARN pequeño de interferencia	63
III.4.5 Cuantificación	64
III.4.6 Estadística	65
IV. RESULTADOS	67
Parte I: La inhibición de TWEAK, ya sea por delección génica o mediante un anticuerpo bloqueante, reduce la carga aterosclerótica y mejora la estabilidad de la placa en los ratones deficientes para ApoE.	67
IV.I.1 La delección de TWEAK reduce el tamaño de e incrementa el cociente colágeno/lípidos en las placas ateroscleróticas presentes en el seno aórtico	67
IV.I.2 La delección de TWEAK reduce el número de macrófagos y células espumosas e incrementa el número de células del músculo liso vascular en el seno aórtico	73
IV.I.3 El tratamiento terapéutico con un anticuerpo monoclonal anti-TWEAK reduce el tamaño de la lesión e incrementa la estabilidad de la placa en el seno aórtico	79

IV.I.4 La delección de TWEAK o el tratamiento terapéutico con anti-TWEAK reduce el tamaño de la lesión y mejora las características relacionadas con la inestabilidad de placa en la arteria braquiocefálica.	80
IV.I.5 La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK disminuye la actividad gelatinolítica en las lesiones ateroscleróticas avanzadas	85
Parte II: TWEAK aumenta la expresión y la secreción de HMGB1 en placas ateroscleróticas humanas y monocitos en cultivo	88
IV.II.1 Presencia y asociación entre la expresión de HMGB1, TWEAK y Fn14 en placas ateroscleróticas de carótida humana	88
IV.II.2 TWEAK aumenta la expresión y la secreción de HMGB1 en monocitos THP-1 cultivados	89
IV.II.3 Regulación por TWEAK de la localización celular de HMGB1	91
IV.II.4 Los efectos sobre la expresión de HMGB1 mediados por TWEAK están restringidos a los macrófagos proinflamatorios (M1) tanto in vitro como en las placas ateroscleróticas carotídeas	91
IV.II.5 Regulación de la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK en monocitos	93
IV.II.6 HMGB1 está implicado en la liberación de MCP-1 mediada por TWEAK	94
IV.II.7 TWEAK modula la expresión génica y proteica de HMGB1 en las placas ateroscleróticas procedentes de ratones deficientes para ApoE	95
V. DISCUSIÓN	97
La delección genética de TWEAK o su bloqueo terapéutico reduce la carga aterosclerótica y mejora la estabilidad de la placa en ratones ateroscleróticos espontáneos	99
TWEAK aumenta la expresión y la secreción de HMGB1 tanto en monocitos cultivados como procedentes de placas ateroscleróticas humanas	104
VI. CONCLUSIONES	109
VII. BIBLIOGRAFÍA	113
VIII. ANEXOS	125



## CLAVE DE ABREVIATURAS

A continuación se detallan todos los acrónimos utilizados a lo largo de la tesis. En la mayoría se ha conservado la nomenclatura correspondiente en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico, en cuyo caso aparece la explicación en inglés en primer lugar (en cursiva), y en segundo lugar la explicación en español.

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: Ácido desoxiribonucleico copia

ApoE: Apolipoproteína E

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

CMLV: células del músculo liso vascular

DD: *Death domain* / dominio letal o de muerte

ERK: *Extracellular Regulated Kinase* / quinasa regulada extracelularmente

FADD: Fas Associated Death Domain / dominio de muerte asociado a Fas

Fn-14: *Fibroblast growth factor-inducible 14* / factor inducible de crecimiento de fibroblastos-14

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* / factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

HDL: *High Density Lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad

HMGB-1: *High Mobility Group Box chromosomal protein 1*

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* / células endoteliales procedentes de vena de cordón umbilical humano

ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule* / molécula de adhesión intercelular

IgG: Inmunoglobulina G

IKK: IκB Kinasa

IL-#: Interleuquina #

INF- $\gamma$ : Interferón gamma

I $\kappa$ B: Inhibidor de kappa B

JUNK: kinasa n-terminal de Jun

KC: *Keratinocyte Chemoattractant* / proteína quimioattractante de queratinocitos

KO: *Knockout* / deficiente para un gen

LDL: Low Density lipoprotein / lipoproteínas de baja densidad

LDLox: oxidated Low Density Lipoprotein / lipoproteínas de baja densidad oxidadas

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1 / proteína quimiotáctica para monocitos

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor* / factor estimulante de colonias de macrófagos

MIP: *Macrophage Inflammatory Protein* / proteína inflamatoria de macrófagos

MMP: mineraloproteinasa

NF- $\kappa$ B: *Nuclear Factor Kappa B* / factor nuclear kappa B

PBS: *Phosphate Buffered Saline* / tampón fosfato salino

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen* / antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: *Polymerase Chain Reaction* / reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* / factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K: *Phosphatidylinositol-3-Kinase* / fosfoinositol 3-quinasa

PMA: *Phorbol myristate acetate* / forbol miristato acetato

RAGE: *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* / receptor para los productos avanzados de glicosilación

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*

ROS: Reactive Oxygen Species / reactivas de oxígeno

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction* / reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SLN: Señal de Localización Nuclear

TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase / desoxinucleotidiltransferasa terminal

TGF $\beta$ : *Transforming growth factor beta 1* / factor de crecimiento transformante 1

TIM: *TRAF Interacting Motif*, /motivo de interacción con TRAF

TLR: *Toll-Like Receptor*

TNF: *Tumoral Necrosis Factor* / factor de necrosis tumoral

TNFR: *Tumoral Necrosis Factor Receptor* / receptor del factor de necrosis tumoral

TNFSFR: *Tumor Necrosis Factor Superfamily Receptor* / receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral

TNFA: *Tumoral Necrosis Factor  $\alpha$*  / factor de necrosis tumoral  $\alpha$

TRADD: *Trail Associated Death Domain*/ dominio de muerte asociado a TRAIL

TRAF: *TNF Receptor Associated Factor* /factor asociado a receptor de TNF

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

TWEAK: *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* / factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral

VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* /molécula de adhesión celular vascular

VEGF-A: *Vascular Endothelial Growth Factor A* / factor de crecimiento endotelial vascular

VLDL: *Very Low Density Lipoprotein* / lipoproteína de muy baja densidad





# INTRODUCCIÓN

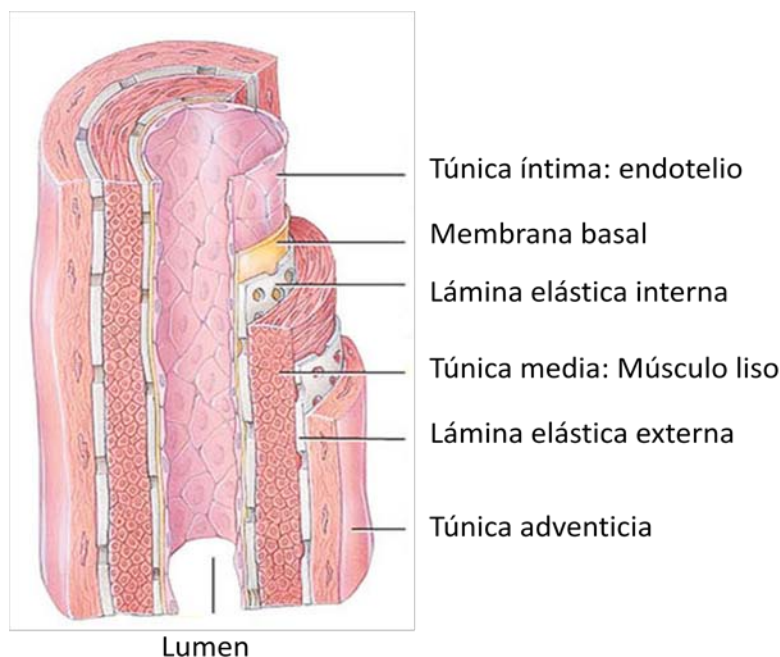


## I.1. LA ATEROSCLEROSIS

El término aterosclerosis fue acuñado por Félix Marchand en 1904 y en él se describen de forma muy precisa los dos rasgos que mejor definen la placa aterosclerótica: por un lado *athéro*, que en griego significa papilla y que está relacionado con el contenido lipídico del interior de la placa; y por el otro *sklerós* o esclerosis, cuyo significado, duro, hace referencia al endurecimiento de la capa fibrótica que separa la sangre del material trombogénico situado en el interior de la lesión (Li and Fang 2004). Curiosamente, la aterosclerosis no es una patología exclusiva de las civilizaciones modernas. La disección de momias egipcias procedentes de altos sacerdotes y sacerdotisas del periodo que va desde el año 1580 al 527 a. C. ha mostrado lesiones en las arterias similares a las encontradas en el hombre moderno. La aterosclerosis en estas momias se describe como “una enfermedad que se caracteriza por la degeneración marcada de la túnica muscular y del endotelio. Estas áreas enfermas y discretas al principio posteriormente se fusionan y finalmente forman zonas relativamente grandes de tejido degenerado, que pueden llegar a la superficie y abrirse en el lumen del tubo” (Ruffer M.A. 1911;Thompson et al. 2013)

Las arterias sanas están formadas por tres capas (Figura 1):

- *Capa íntima*: Compuesta por una capa de células endoteliales que reviste la superficie interna del vaso y una membrana limitante elástica interna, que la separa de la media. El endotelio se apoya en la capa subendotelial, constituida por tejido conjuntivo que puede presentar células del músculo liso vascular (CMLVs) de manera dispersa. La membrana elástica es tubular y perforada, permitiendo la difusión de los metabolitos que nutren las células de la pared arterial.
- *Capa media*: Formada principalmente por CMLVs dispuestas circularmente a las que se agregan cantidades variables de elastina, colágeno y proteoglicanos. Las CMLVs son células metabólicamente muy activas y responsables de la síntesis de la matriz extracelular. La media posee una lámina elástica externa que la separa de la capa adventicia.
- *Capa adventicia*: Consta principalmente de fibras de colágeno y elastina. Esta capa continúa con el tejido conjuntivo y adiposo que envuelve los *vasa vasorum*, los cuales desempeñan una función principalmente estructural y nutritiva.



**Figura 1. Estructura de la pared arterial**

En las arterias sanas, la sangre oxigenada circula libremente desde el corazón hasta los demás órganos y extremidades; mientras que en las arterias ateroscleróticas el flujo sanguíneo puede verse seriamente comprometido a causa del engrosamiento de la capa íntima. Hay que puntualizar que la enfermedad por sí sola no siempre causa la muerte. En los estadios más tempranos, las arterias pueden remodelarse para mantener el área luminal y así contrarrestar el engrosamiento de la íntima. No obstante, si la lesión se expande más de lo que el remodelado hacia fuera puede compensar, el flujo sanguíneo puede reducirse llegando incluso a causar dolor (lo que se conoce comúnmente como angina). Sin embargo las consecuencias clínicas son mucho más significativas si la lesión inicial deriva en la formación y posterior rotura de una placa fibrótica. Esta rotura tiene como resultado el inevitable contacto entre la sangre circulante y el núcleo trombogénico del interior de la lesión que conduce a la formación de un trombo que podría restringir gravemente la luz del vaso. Aproximadamente el 75% de los trombos responsables de los síndromes coronarios agudos provienen de la rotura de una placa aterosclerótica (Falk 1991). Afortunadamente no todas las roturas de placas ateroscleróticas dan lugar a una trombosis vaso-oclusiva. La rotura puede ser clínicamente silenciosa y repararse a sí misma por la acumulación de células del músculo liso en el sitio de la fractura y que son las responsables de la secreción de la matriz extracelular fibrótica (Mann and Davies 1999). Estas sucesivas acumulaciones son las culpables de la apariencia estriada de la placa y se conocen como cápsulas enterradas (Virmani et al. 2000). No obstante, hay

que tener en cuenta que la reparación de la placa puede en ocasiones conducir a un aumento de la estenosis como consecuencia del crecimiento de la placa aterosclerótica (Burke et al. 2001).

### **I.1.1 Patogenia de la aterosclerosis.**

Anteriormente considerada como una mera enfermedad acumuladora de colesterol, a día de hoy, entendemos la aterosclerosis como un desorden inflamatorio crónico que afecta mayoritariamente a las arterias de gran calibre. Su origen reside en la suma de diversos factores de riesgo entre los que se incluyen tanto células de la pared arterial como de la sangre, así como las interacciones moleculares que se dan entre ellas (Libby and Theroux 2005a).

Se considera la disfunción endotelial, entendida como la pérdida de la función adecuada del endotelio, como el primer evento clave en el inicio de la aterosclerosis. En la lista de agentes implicados en la disfunción endotelial encontramos tanto factores externos como es el caso de ciertos productos bacterianos; como factores de riesgo interno como la dislipemia, hormonas vasoconstrictoras implicadas en la hipertensión, productos de glicosilación asociados a la hiperglicemia o citoquinas proinflamatorias, que poseen la capacidad de inducir pequeños cambios en la continuidad de la barrera endotelial del vaso arterial. De todos los factores de riesgo enumerados anteriormente, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) merecen una mención especial, ya que poseen la capacidad de aprovechar las pequeñas alteraciones en la barrera para entrar y acumularse en la zona subendotelial. Debido al aumento de la concentración plasmática de las LDLs, el tiempo de residencia en el espacio subendotelial puede verse incrementado, aumentando así las probabilidades de oxidación a cargo de los radicales libres de oxígeno (ROS) producidos por el endotelio adyacente, las CMLV y/o los macrófagos. Es así como se generan las LDL oxidadas (LDLox), que pueden activar al endotelio y estimular la expresión de moléculas de adhesión celular y de sustancias quimiotácticas como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1), favoreciendo la adhesión y migración hacia la íntima de leucocitos circulantes y CMLV.

La migración de monocitos hacia la región subendotelial da lugar a un incremento de estas células en la capa íntima, donde son expuestos a diversos factores secretados por las propias células endoteliales y por las CMLV, lo que provocará su activación y diferenciación a macrófagos. Las LDL modificadas son reconocidas por los receptores basurero o “scavengers” que se encuentran en los macrófagos y en las CMLV. Este receptor, al no estar regulado por el contenido de colesterol intracelular, da lugar a una sobrecarga de lípidos en los macrófagos y las CMLV, formándose “las células espumosas”. La acumulación de estas células da lugar al primer paso de la aterosclerosis, la formación de la estría grasa. (Figura 2)

Después de la formación de la estría grasa, la continua acumulación de lípidos, de productos liberados por los macrófagos y de ROS da lugar a un mayor daño endotelial, acompañado por citolisis. Por otro lado los monocitos y las células endoteliales liberan factores mitogénicos que estimulan la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de las CMLV. Todo ello da lugar a que la lesión progrese hacia una placa madura. La ingesta continuada de LDLox por las células espumosas provoca finalmente la rotura de las mismas, vertiendo su contenido lipídico al medio extracelular y dando como resultado la formación de un núcleo lipídico avascular con bajo número de células, recubierto por una matriz extracelular rica en colágeno, elastina y células musculares lisas, denominada cápsula fibrosa. A su vez los macrófagos liberan metaloproteinasas de matriz capaces de degradar el colágeno que forma la cápsula. Este desequilibrio entre síntesis y degradación de colágeno debilita la placa y la hace vulnerable, muy propensa a la rotura. La presencia de un proceso inflamatorio en la placa aterosclerótica, es un mecanismo decisivo que conduce a la desestabilización, la rotura y la consiguiente formación de un trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más graves de la aterosclerosis. El evento cardiovascular resultante se produce cuando la capa fibrosa, rica en colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, se rompe; es entonces cuando el núcleo lipídico rico en factor tisular procedente de los macrófagos, se pone en contacto con la sangre, lo que desencadena la trombosis (Fernandez-Ortiz et al. 1994; Toschi et al. 1997; Viles-Gonzalez et al. 2006).

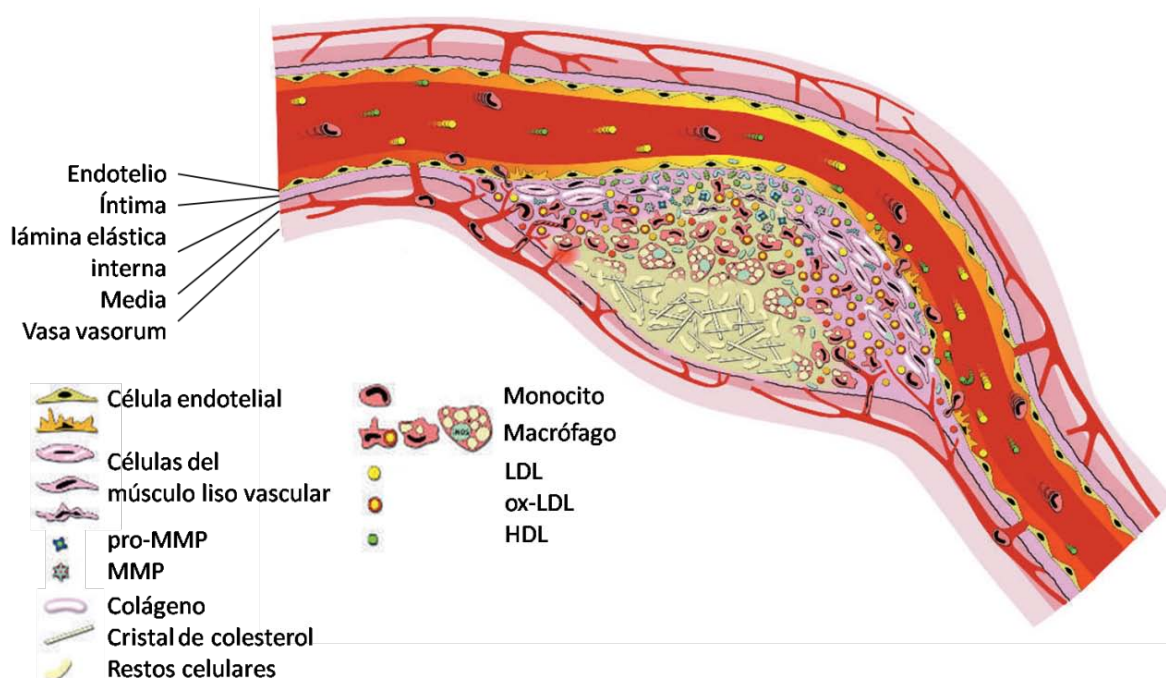


Figura 2. Representación de una placa aterosclerótica. Modificado de CJ Slager, 2005.

### I.1.2 Aspectos que afectan a la integridad de la placa

Como se ha comentado anteriormente, la principal causa de muerte asociada a la aterosclerosis no es la placa en sí, sino el proceso isquémico que tiene lugar tras un evento trombótico u ocluyente cuando la placa se rompe. Es por ello que cuanto más estable sea la placa aterosclerótica, menos posibilidades tendrá de romperse y por ende acabar provocando un infarto o un ictus.

Una placa proclive a la rotura se caracteriza por la presencia de los siguientes rasgos: (Choi and Mintz 2010;Naghavi et al. 2003)

- \*Gran núcleo lipídico compuesto de células espumosas, necróticas, apoptóticas y detritus, y que puede llegar a ocupar más del cuarenta por ciento del volumen total de la placa.
- \*Capa fibrosa de menos de 100 micras de grosor
- \*Remodelado positivo
- \*Calcificación marcada o difusa
- \*Escasa presencia de células del músculo liso vascular
- \*Abundante vasa vasorum y/o hemorragias intraplaca.

De todas estas características, quizás las más relevantes sean las dos primeras, ya que juntas son capaces de convertir una placa estable en otra inestable o propensa a la rotura. La presencia de una capa fibrosa (hecha a base de colágeno, proteoglicanos y CMLV) que está continuamente debilitándose debido, tanto a un proceso activo de degradación como a la ausencia de reparación, puede dar lugar a una eventual fisura en algún punto de la placa que tendrá como resultado el contacto del contenido trombogénico del núcleo lipídico con las plaquetas circulantes junto con los factores de coagulación y el factor tisular.

Dentro de los factores físicos que favorecen la rotura de la placa se encuentran la presión arterial, el diámetro de la arteria, el impacto de la sangre sobre la placa, y la densidad de los lípidos acumulados.

A nivel celular, las principales células afectadas durante el proceso que convierte una placa aterosclerótica en una placa propensa a la rotura son: las células endoteliales, las CMLV y los macrófagos (Lafont 2003).

·Las células endoteliales juegan un papel clave en el sentido en que constituyen la barrera más importante contra la trombosis, y su disfunción se traduce en una mayor atracción de células inflamatorias hacia el interior de la placa donde pueden inducir espasmos y participar en la trombogénesis.

·Las CMLV son las responsables de producir la matriz extracelular que garantiza la integridad de la pared arterial. Su disminución en número hace que no sean capaces de garantizar la síntesis y

reparación del tejido de la matriz, lo cual facilita que los macrófagos la destruyan activamente favoreciendo así las condiciones de rotura.

· Los macrófagos por su parte, representan el caballo de Troya de la placa aterosclerótica ya que juegan un papel clave en la inflamación no específica gracias a la secreción de citoquinas, además de concentrar en su interior los lípidos oxidados convirtiéndose así en células espumosas capaces de inducir la expresión de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales. También son los responsables de debilitar la capa fibrosa vía secreción de metaloproteinasas (MMP).

### **I.1.3 Modelo murino de aterosclerosis: el genotipo deficiente en apolipoproteína E**

La apolipoproteína E (ApoE) es una clase de apolipoproteína que juega un papel clave en la protección frente a la aterosclerosis y junto con otras apolipoproteínas, fosfolípidos, colesterol libre, triglicéridos y ésteres de colesterol constituye las lipoproteínas. La función de las lipoproteínas es transportar moléculas lipídicas hidrofóbicas a través de un medio acuoso como es la sangre y el sistema linfático. En función del contenido de proteínas presentarán una mayor o menor densidad lo que nos permitirá clasificarlas en cuatro grupos: lipoproteínas de alta densidad, baja densidad, muy baja densidad y quilomicrones.

La apolipoproteína E se expresa en multitud de órganos si bien, el hígado es su principal fuente; constituye el componente principal de los quilomicrones y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) y se une a receptores de la familia de lipoproteínas de baja densidad.

En humanos la expresión disminuida de ApoE causada por algunos tipos de enfermedad genética como la disbetalipoproteinemia familiar, tiene como consecuencia un perfil lipídico alterado y una mayor prevalencia de la aterosclerosis.

En 1992 Zhang y colaboradores (Zhang et al. 1992) desarrollaron el primer modelo de ratón murino de aterosclerosis espontánea eliminando las dos copias de la apolipoproteína E del genoma (ratón ApoE deficiente). Este pequeño cambio convertía automáticamente a uno de los animales más resistentes a la aterosclerosis en otro completamente vulnerable a la enfermedad sin necesidad de una dieta rica en grasa. Este nuevo modelo permitía trazar la progresión de la aterosclerosis en una escala temporal mucho más manejable y además, se caracteriza por no tener efectos ni en la fertilidad ni en el peso al nacer por lo que aparte de la aterosclerosis, los ratones resultantes están sanos.

Una cualidad importante de la aterosclerosis es que tiene lugar en arterias sistémicas, nunca en venas ni arterias pulmonares, lo cual sugiere que los factores hemodinámicos locales, las propiedades de la pared vascular y la presión arterial juegan un papel crucial en la formación de la lesión. Los ratones, por su parte, desarrollan lesiones de manera similar, lo que induce a pensar que



la pared arterial está afectada de la misma forma a pesar de las diferencias de estrés de flujo entre las dos especies (Suo et al. 2007; Weinberg and Ross 2007).

En estos ratones las lesiones ateroscleróticas se localizan en regiones de estrés de flujo bajo u oscilatorio (Huo, 2008), particularmente en el seno aórtico, la arteria braquiocefálica, la curvatura menor del arco aórtico, los puntos de ramificación de las arterias subclavia y carótida izquierda y en menor grado, en la aorta torácica descendente.

#### I.1.4 La arteria braquiocefálica

A pesar de que el modelo murino de aterosclerosis espontánea nos ha ayudado mucho a la hora de dilucidar las claves del origen y la progresión de la aterosclerosis, la mayoría de los trabajos carecían de estudios centrados en las lesiones más complejas y avanzadas tal y como encontramos en los humanos. Incluso en los pocos casos en los que las lesiones ateroscleróticas de los ratones progresan hasta la oclusión completa del vaso, la morfología sugiere que la obstrucción de la luz debida a la formación de un gran xantoma es un patrón raramente observado en humanos. Por lo tanto, mientras que los modelos murinos nos han ayudado a explicar la formación de la estría grasa y su progresión hacia la placa aterosclerótica, apenas nos han proporcionado información acerca de los mecanismos propuestos implicados en la progresión, rotura y reparación de una placa inestable.

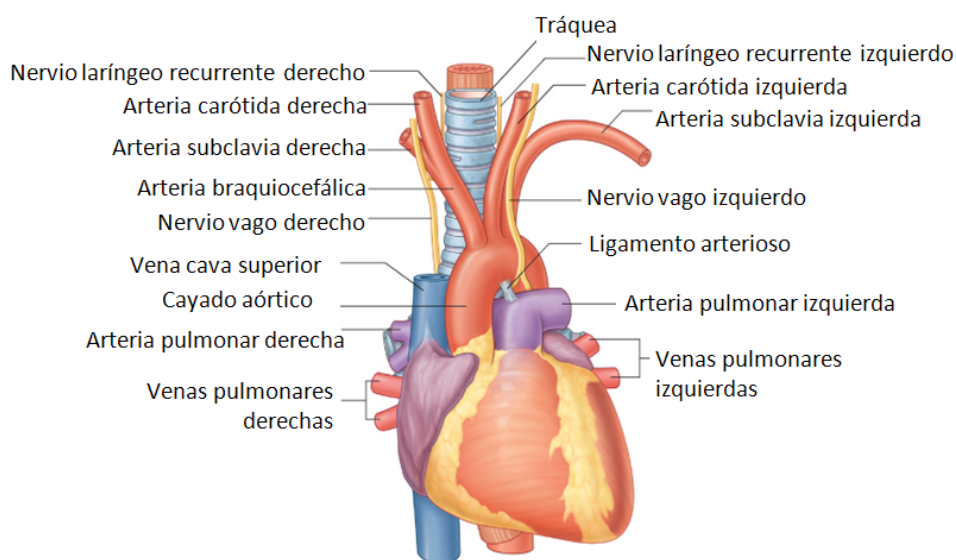
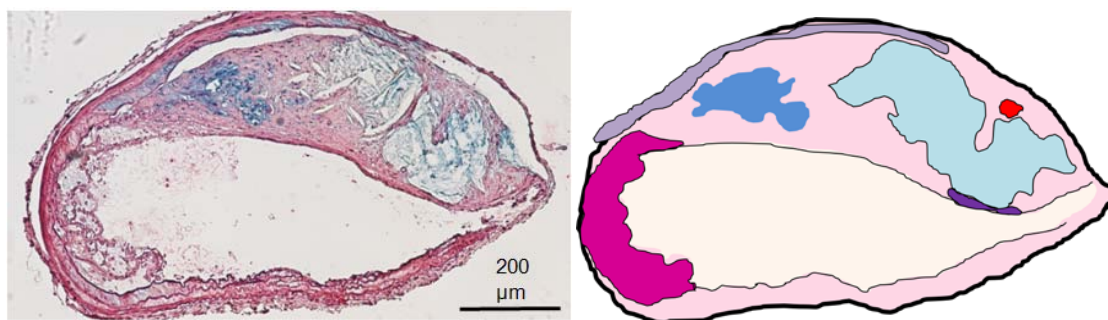


Figura 3. Representación esquemática del corazón y sus ramificaciones.

En el año 2000, Rosenfeld y colaboradores (Rosenfeld et al. 2000) descubrieron que la arteria braquiocefálica o innominada, una de las tres ramificaciones del arco aórtico y que a su vez se divide dando lugar a la carótida y subclavia derechas (Figura 3), constituye el sitio predilecto para la formación de placas ateroscleróticas avanzadas en los ratones deficientes en ApoE y, además, es el único punto de toda la vasculatura del ratón en donde podemos encontrar placas ateroscleróticas lo más parecidas a las encontradas en humanos, es decir que comparten la mayoría de los rasgos definitorios como (Figura 4):

- Xantomas laterales: acumulación de agregados de macrófagos/células espumosas en los laterales de la placa aterosclerótica
- Hemorragia intraplaca: presencia de hematíes libres en el interior de la placa, normalmente dentro de los xantomas laterales o del núcleo necrótico.
- Células similares a condrocitos: células del músculo liso vascular que presentan fenotipo de condrocitos. Segregan una matriz extracelular responsable de la calcificación de la placa.
- Cápsulas enterradas: roturas de placa reparadas. Esta reparación es favorable ya que impide la formación de un posible trombo al no desprenderse ninguna parte de la placa, aunque esta reparación implica en la mayoría de los casos un aumento del tamaño de la lesión que puede afectar al área luminal del vaso.
- Erosión de la media: presencia de componentes de la placa en la capa media de la arteria
- Fina capa fibrosa: la capa que recubre la placa aterosclerótica inestable está formada por un reducido contenido de colágeno, proteoglicanos y células musculares provenientes de la media. Esta fina capa se encuentra activamente debilitada debido tanto a un proceso lítico, como a una falta de reparación. La rotura de esta capa en cualquier punto supondría el contacto de las plaquetas circulantes de la sangre con el material trombogénico del interior de la placa aterosclerótica. De este modo podemos afirmar que cuanto más fina sea la capa que recubre la placa, más posibilidades tendrá ésta de romperse.
- Gran núcleo lipídico: también conocido como núcleo necrótico, está compuesto por lípidos, células espumosas, células necróticas y apoptóticas y detritus celulares. Se caracteriza por ocupar gran parte del tamaño de la placa.



**Figura 4. Lesión aterosclerótica en arteria braquiocefálica.** A la derecha fotografía de una placa de ateroma proveniente de una arteria braquiocefálica de un ratón ApoE<sup>-/-</sup> de 40 semanas. Pentacrómico de Movat. A la izquierda, dibujo esquematizado de la misma lesión.

Erosión medial	Xantoma lateral	Células similares a condrocitos
Núcleo necrótico	Hemorragia intraplaca	Fina capa fibrosa

Si tomamos en consideración, por un lado, la posibilidad de mimetizar en un modelo animal una enfermedad tan compleja como la aterosclerosis y por otro, el poder disponer de lesiones ateroscleróticas avanzadas similares y equiparables a las humanas, llegamos a la conclusión de que el modelo murino deficiente en ApoE es perfectamente válido para analizar el efecto de nuevos fármacos para la enfermedad aterosclerótica.

## I.2. SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Las citoquinas son un grupo grande y diverso de proteínas solubles o asociadas a la membrana plasmática y su tamaño varía de 3 a 70 KDa. Su función principal es actuar como principales mediadores de la comunicación celular y coordinar actividades celulares en situaciones de inflamación, daño o lesión tisular. Este papel pueden realizarlo de diferentes formas: intracrina (dentro de la propia célula), autocrina (la citoquina actúa sobre la misma célula que la secreta), paracrina (estimulando células adyacentes) o endocrina (actúan sobre células muy alejadas de la célula secretora gracias al transporte a través del flujo sanguíneo) cannon

(Cannon 2000) La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) forma un subgrupo de citoquinas y receptores que ha atraído considerable interés como fuente potencial de dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas complejas. Los ligandos de la superfamilia de TNF se expresan principalmente en forma de proteínas transmembrana de tipo II, pero en algunos casos se procesan en pequeñas proteínas secretadas que conservan su actividad biológica. Tanto las citoquinas ancladas como las solubles contienen un dominio C-terminal homólogo de la superfamilia de TNF que media la autotrimerización y la unión al receptor. Los

miembros de la superfamilia de TNF se unen a uno o más miembros de la superfamilia de receptores de TNF (TNFR) siendo la mayoría de los cuales proteínas transmembrana de tipo I o tipo III. Estos receptores se caracterizan por la presencia de una región de unión a ligando extracelular que contiene de uno a cuatro dominios ricos en residuos de cisteína y una cola citoplasmática con uno o más sitios de unión a proteína (Winkles 2008).

En función de las secuencias citoplasmáticas y las propiedades de señalización, la superfamilia de TNFR se puede dividir en tres subgrupos. El primer grupo, está constituido por Fas, TNFR1, DR3, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) y DR6. Estos receptores presentan en su región citoplasmática una secuencia de aminoácidos denominada dominio letal (DD de Death Domain). A través de este dominio Fas, TRAILR1 y TRAILR2 interaccionan con la proteína FADD (dominio letal asociado a Fas), mientras TNFR1, DR3 y DR6 se unen al adaptador TRADD (dominio letal asociado a TNFR). Estas dos moléculas son capaces de activar la cascada de caspasas, que se encargan de degradar proteínas clave del funcionamiento celular, como las proteínas del citoesqueleto o de la lámina nuclear, lo que conduce a la célula a la entrada en apoptosis. Este tipo de receptores también inducen la activación de factores de transcripción, mediante la unión de la molécula adaptadora TRAF2 (Factor Asociado al Receptor TNF 2). El segundo grupo es más numeroso y comprende a los receptores CD40, TNFR2, CD30, CD27, TNFR1, LT- $\beta$ R, BAFFR, OX40, BCMA, 4-1BB, TACI, RANK, NGFR, HVEM, GITR, TROY, EDAR, XEDAR, RELT Y Fn14. La mayoría de estos receptores contienen uno o más motivos de secuencia corta en sus regiones citoplasmáticas que sirven como puntos de unión para otro grupo de moléculas citoplasmáticas denominadas factores de asociación a receptores de TNF (TRAF). Los motivos a los que unen los TRAF se denominan TIM (TRAF Interacting Motif). La familia TRAF consta de 6 miembros en el humano (TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5 y TRAF6). La unión de uno o más TRAF a los motivos TIM provoca la activación de numerosas cascadas de quinasas, que en último término, producen la activación de vías de señalización celular tan importantes como el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), la quinasa N-terminal de Jun (JNK), p38, la quinasa regulada extracelularmente (ERK) y fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), que regulan numerosos procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis. El tercer grupo está formado por DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) y OPG. Se caracterizan por no poseer dominios funcionales para la transmisión de señales en sus dominios citoplasmáticos. Aunque este grupo de receptores no puede transmitir señales intracelulares, compiten con otros receptores de los otros dos grupos por la unión al ligando. Así, su función parece ser la de impedir la transmisión de la señal a partir de otros receptores de la familia.

La interacción entre los miembros de la superfamilia del TNF y sus correspondientes receptores tiene como resultado diversas acciones biológicas que participan en el desarrollo de la

aterosclerosis. Entre estas respuestas se incluye la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas de matriz y factor tisular, los cuales aumentan la inestabilidad de la placa aterosclerótica.

### I.2.1 TWEAK

El factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK), llamado así por sus siglas en inglés (Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis), es una citoquina de la superfamilia del TNF que activa al receptor Fn14 (factor inducible por el factor de crecimiento de fibroblastos-14) y que fue identificada en 1997 (Chicheportiche et al. 1997).

En humanos, TWEAK es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 249 aminoácidos codificada por un gen localizado en la posición 17p13.1. Está formada por un dominio C-terminal extracelular de 206 aminoácidos que contiene el sitio de unión al receptor y un sitio de N-glicosilación (Chicheportiche, Bourdon, Xu, Hsu, Scott, Hession, Garcia, & Browning 1997), un dominio transmembrana de 25 aminoácidos y un dominio N-terminal intracelular de 18 aminoácidos. La mayoría de las células expresan dos isoformas de TWEAK, una forma anclada a la membrana (mTWEAK) de 30 KDa y otra forma soluble (sTWEAK) de 18 Kda que se forma por el procesamiento de la isoforma anclada a la membrana (Campbell et al. 2006;Wiley and Winkles 2003), y que básicamente está formada por la región C-terminal con el subdominio de unión al receptor. Los genes humano y murino de TWEAK presentan una similitud del 93% en la secuencia de unión al receptor. Así pues, tanto sTWEAK como mTWEAK humano se unen al receptor Fn14 murino con la misma afinidad que al Fn14 humano (Bossen et al. 2006).

La configuración espacial en estructura de lámina que adopta el dominio de unión al receptor permite que TWEAK se organice en trímeros. Las ranuras que quedan entre las subunidades del trímero constituyen los lugares de unión del receptor.

El ARN mensajero (ARNm) de TWEAK se expresa en numerosos tejidos y tipos celulares, alcanzando niveles relativamente altos en los órganos más importantes, como son corazón, cerebro, músculo esquelético y páncreas. Los tejidos relacionados con el sistema inmune, como páncreas, nódulos linfáticos y timo, también expresan ARNm de TWEAK. Además, se ha detectado en la placenta durante el primer trimestre de embarazo (Phillips et al. 2001), en varias líneas celulares de origen tumoral (Chicheportiche, Bourdon, Xu, Hsu, Scott, Hession, Garcia, & Browning 1997;Kawakita et al. 2004;Kawakita et al. 2005), macrófagos peritoneales de ratón (Chicheportiche et al. 2000), fibroblastos humanos (Semov et al. 2002), eritroblastos (Felli et al. 2005) y, en el sistema nervioso central, en células endoteliales, astrocitos y neuronas (Desplat-Jego et al. 2005).

### I.2.2.1 El receptor de TWEAK: Fn14

En 2001 se identificó el primer receptor para TWEAK al que los autores denominaron receptor de TWEAK (TWEAKR) (Wiley et al. 2001). No obstante posteriormente se supo que TWEAKR era en realidad idéntico a Fn14 (Factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14). Fn14 había sido descrito previamente como el producto de un gen inducible por factores de crecimiento en fibroblastos murinos (Meighan-Mantha et al. 1999). Se trata de una proteína transmembrana de tipo I con 129 aminoácidos y 13.911 kDa de peso molecular (Feng et al. 2000; Wiley, Cassiano, Lofton, Davis-Smith, Winkles, Lindner, Liu, Daniel, Smith, & Fanslow 2001).

Cuando se procesa es el miembro más pequeño de los receptores de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRSF). Cabe destacar que ningún otro miembro conocido de la superfamilia del TNF tiene capacidad de unión a Fn14. Los receptores Fn14 humano y murino presentan una similitud del 90%, y ambos tienen características estructurales típicas de la TNFRSF. En 2007 se publicó que TWEAK se une también a CD163 (Bover et al. 2007). CD163 es un receptor basurero de expresión restringida a monocitos/macrófagos, que es responsable de aclarar de la circulación los complejos haptoglobina-hemoglobina. CD163 podría actuar como un receptor basurero para TWEAK en situaciones patológicas (Moreno et al. 2009a).

Fn14 se expresa en una gran variedad de tejidos adultos, alcanzando niveles relativamente altos en corazón, riñón, pulmones y placenta, así como en cultivos celulares de células endoteliales procedentes de vena umbilical y células del músculo liso en estado proliferativo.

### I.2.2.2 Señalización del sistema TWEAK-Fn14

Estudios realizados en otros miembros de la superfamilia de TNF cuya señal interacciona con miembros de la superfamilia de TNFR que también carecen de dominios letales, han revelado que la unión del ligando al dominio extracelular del receptor induce la trimerización de este último seguido de la asociación de proteínas TRAF a la región citoplasmática (TIM) y finalmente la activación de cascadas de señalización intracelular (Bodmer et al. 2002; Locksley et al. 2001). La región citoplasmática de Fn14, de sólo 28 aminoácidos de longitud, contiene un único motivo consenso de unión al factor asociado al receptor de TNF (TRAF) al cual pueden unirse TRAF1, TRAF2, TRAF3 Y TRAF5. La secuencia consenso de aminoácidos de este motivo de unión es PIEET (Winkles 2008) (Figura 5).

Como se ha mencionado anteriormente, la región citoplasmática de Fn14 no contiene dominio de muerte por lo que es improbable que la unión de TWEAK a Fn14 pueda desencadenar la vía apoptótica extrínseca caracterizada por la formación de un complejo de señalización inductor de muerte así como la activación de la caspasa 8 o 10 (Peter and Krammer 2003).

El tratamiento con TWEAK de células que expresan Fn14 ha demostrado la activación de diferentes cascadas de señalización si bien, parece que la vía de activación de NF- $\kappa$ B constituye la respuesta celular universal. Son muchos los distintos grupos que a través de una gran variedad de tipos celulares, han publicado que el binomio TWEAK-Fn14 activa la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B (Winkles 2008). En función del tipo celular, las otras vías de señalización que son activadas por TWEAK y su receptor son la vía canónica de ERK, JNK y IP3K (Ando et al. 2006; Dogra et al. 2007; Donohue et al. 2003). Como resultado de la activación de la vía de NF $\kappa$ B, es lógico pensar que el tratamiento in vitro con TWEAK induzca la expresión de genes diana de NF- $\kappa$ B tales como la metaloproteínasa-9, citoquinas proinflamatorias, las proteínas antiapoptóticas A20, cIAP2, BCL-2 y BCL-XL, TRAF1, TRAF3 y por supuesto Fn14 (Girgenrath et al. 2006).

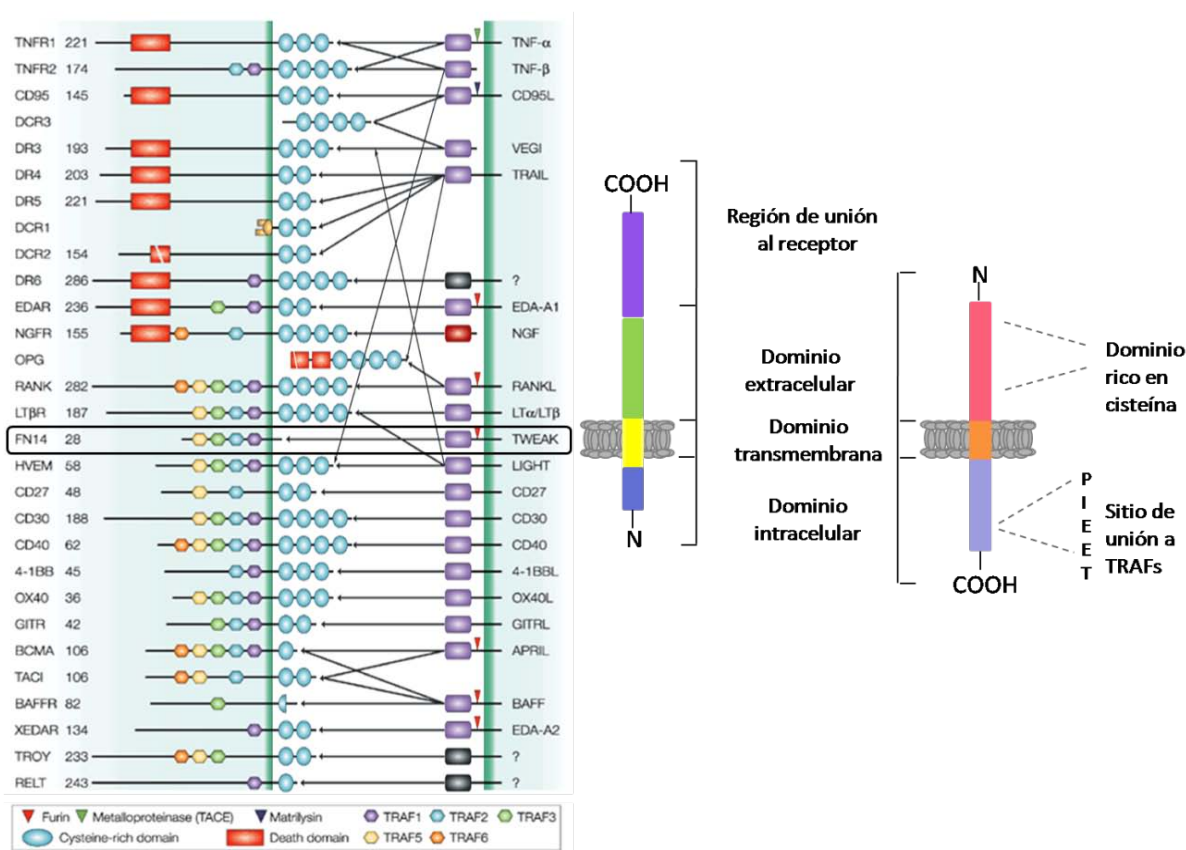


Figura 5. Esquema de los miembros de la superfamilia de TNF y representación de TWEAK y Fn14 respectivamente. (Modificado de Aggarwal, 2003 y Winkles 2008)

### I.2.2.3 Papel de TWEAK y Fn14 en la aterosclerosis

Tanto TWEAK como Fn14 se expresan en diferentes tipos celulares incluyendo células endoteliales y células musculares lisas, si bien hay que aclarar que Fn14 no se expresa en la pared

sana, mientras que TWEAK sí lo hace. Por el contrario, en condiciones patológicas sí se ha detectado la presencia de Fn14 en la pared vascular aterosclerótica (Munoz-Garcia et al. 2006).

La interacción de TWEAK con Fn14 da como resultado multitud de repuestas biológicas cuyos efectos están presentes en todas las fases de la aterosclerosis. En la primera fase de la enfermedad, la formación de la estría grasa, esta interacción está implicada en la inducción de la secreción de moléculas de adhesión (ICAM-1, E-SELECTINA) y citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (IL-8, MCP-1) que tendrá como resultado en primer lugar, la adhesión y posterior penetración en la pared vascular de los monocitos circulantes, y finalmente, su migración hacia la capa íntima donde se diferenciarán a macrófagos que a su vez expresarán receptores específicos para lipoproteínas modificadas (por ejemplo las LDL oxidadas). En este sentido se ha demostrado que un anticuerpo que bloquea la interacción TWEAK-Fn14 en células endoteliales procedentes de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) inhibe la expresión de las moléculas de adhesión mencionadas, mientras que en esas mismas células, la estimulación con TWEAK induce la secreción tanto de IL-8 como de MCP-1.

El siguiente paso de la aterosclerosis donde está implicado el eje TWEAK-Fn14 es la cronificación del proceso inflamatorio que tiene lugar en la capa íntima de la pared vascular. En este sentido se ha demostrado que TWEAK promueve la proliferación y migración de las diferentes células vasculares a través de su receptor Fn14, lo cual tiene como resultado la aparición de nuevas células del músculo liso vascular que serán capaces de atraer a más células inflamatorias perpetuando así la respuesta inflamatoria. Por otra parte tanto la proliferación como la migración de las células del músculo liso vascular contribuyen activamente al progresivo engrosamiento de la placa en ciernes.

Finalmente, otro proceso fundamental en el avance de la aterosclerosis es la progresiva desestabilización de la placa que pasa de un fenotipo estable a otro vulnerable o propenso a la ruptura. En esta fase TWEAK, a través de su receptor Fn14, es capaz de aumentar la actividad de las metaloproteinasas de matriz MMP-9 y MMP-2 secretadas por los macrófagos y las CMLV. Estas gelatinasas son las responsables de degradar poco a poco la capa fibrótica que envuelve la placa aterosclerótica y de cuya integridad depende gran parte de la estabilidad de placa aterosclerótica. Además de en la progresiva degradación que tiene lugar en la capa fibrótica, la vía TWEAK-Fn14 también es capaz de estimular la apoptosis (siempre como coadyuvante de otras citoquinas) de las células dentro de la placa, lo cual hace que ésta se vuelva más lábil y propensa a la rotura (Munoz-Garcia, Martin-Ventura, Martinez, Sanchez, Hernandez, Ortega, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2006).



### I.3. NF- $\kappa$ B

Dentro de los factores de transcripción diméricos, los miembros de la familia del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) regulan la expresión de un gran número de genes implicados en respuesta inmune, inflamación, apoptosis o cáncer. Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B TF) son rápidamente activados en respuesta a varios estímulos como citoquinas, agentes infecciosos y roturas de ADN de doble cadena inducidas por radiación (Hacker and Karin 2006). En mamíferos, la familia de NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF $\kappa$ B1 (p50/p105) y NF $\kappa$ B2 (p52/p100). De este grupo, las tres primeras se sintetizan directamente en su forma madura, mientras que NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2 lo hacen en forma de precursores. Todas estas proteínas pueden formar diferentes complejos de homo o heterodímeros y se caracterizan por compartir un dominio de homología Rel en su extremo N terminal que media la dimerización, la unión al ADN y la interacción con sus correspondientes proteínas inhibidoras I $\kappa$ B (Hayden and Ghosh 2004). La combinación más abundante y que generalmente conocemos como NF- $\kappa$ B es el heterodímero formado por las proteínas p50 y p65 (RelA).

En células en reposo el factor de transcripción se presenta asociado a su correspondiente proteína represora denominada I $\kappa$ B. La familia de I $\kappa$ B está compuesta por siete proteínas: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , BCL-3, I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  y los precursores p105 y p100. La inactivación de NF- $\kappa$ B por parte de estas proteínas se consigue reteniendo en el citoplasma las proteínas que forman el complejo NF- $\kappa$ B enmascarando su señal de localización nuclear (SLN).

En la vía canónica de activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B el dímero constituido por las proteínas p65 y p50 está unido a la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . La unión del I $\kappa$ B a su receptor (TNFR-1, TRAF2) (Hayden & Ghosh 2004) conduce a la activación del complejo IKK (I $\kappa$ B kinasa) mediante autofosforilación. El complejo IKK está compuesto por tres subunidades cada una de ellas codificada por un gen distinto: IKK- $\alpha$ /1, IKK- $\beta$ /2 y IKK- $\gamma$ /NEMO. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son catalíticamente activas mientras que la subunidad  $\gamma$  posee una función reguladora. IKK a su vez fosforila las proteínas I $\kappa$ B lo cual da lugar al reconocimiento por parte de las enzimas ubiquitinadoras y su posterior degradación mediante el proteasoma 26S (Chen 2005). La desaparición de la proteína represora I $\kappa$ B libera los heterodímeros p50/p65 haciendo que la SLN quede expuesta y permitiendo su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el dímero p50/p65 se une a los elementos  $\kappa$ B (GGGRNYYCC, donde R es una purina, Y una pirimidina y N puede ser cualquier base) (Kutuk and Basaga 2003) de los promotores de los genes diana, induciendo de esta manera la transcripción de factores pro-inflamatorios como citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), quimioquinas (MCP-1, RANTES), factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , PDGF), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectina), enzimas

(COX-2, iNOS) y proteínas de fase aguda entre otras muchas (Chen et al. 1999; Handel and Girgis 2001) (Lee and Burckart 1998; Tak and Firestein 2001; Yamamoto and Gaynor 2004) (Figura 6).

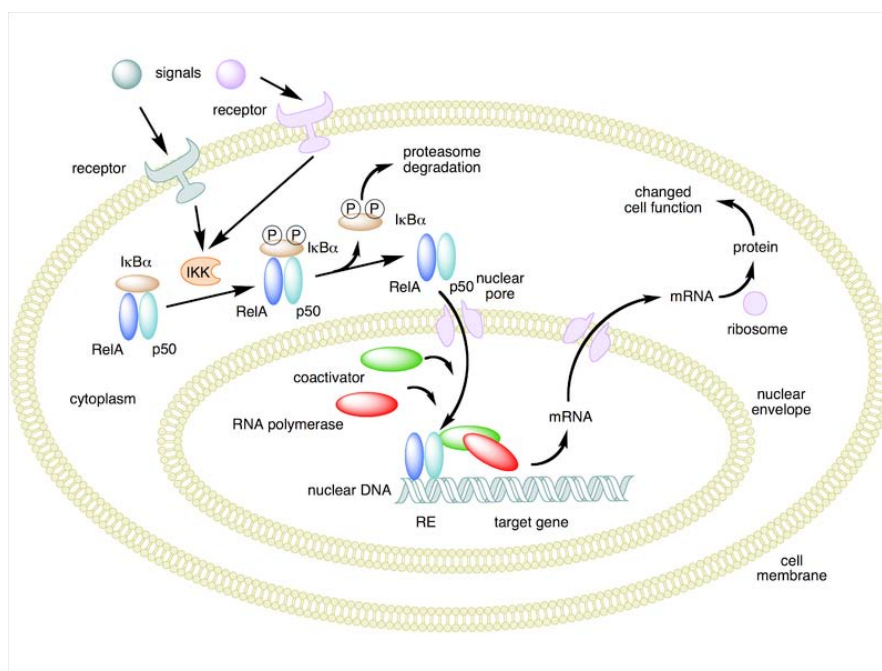


Figura 6. Esquema de la vía canónica de activación del factor nuclear kappa B.

### I.3.1 Papel de NF- κB en la aterosclerosis

El factor nuclear kappa B representa una pieza clave de un sistema de transducción de señales intracelulares implicado en varias patologías entre las que se encuentra la aterosclerosis. De hecho, la activación de la señalización mediada por NF-κB está presente en todas las etapas de la aterosclerosis, desde la formación de placa hasta su desestabilización y rotura.

La activación de NF-κB en células endoteliales desencadena la expresión de un amplio rango de moléculas de adhesión como por ejemplo ICAM-1, VCAM-1, selectinas P y E, IL-1, IL-6, TNFα, metaloproteinasas 1 y 9 y MCP-1 que en su conjunto contribuyen a coordinar la invasión y posterior asentamiento de las células inflamatorias en la pared vascular, así como la migración de las células del músculo liso que da como resultado la remodelación de la matriz extracelular (Pamukcu et al. 2010).

Asimismo la vía canónica de activación de NF-κB controla los mediadores implicados en la regulación de factores protrombóticos de las placas ateroscleróticas humanas incluyendo el factor tisular y las metaloproteinasas de matriz (Monaco et al. 2004). Además en 2011 Cuhlmann y colaboradores demostraron que el flujo sanguíneo turbulento promueve la inflamación arterial a través de la inducción de la expresión de NF-κB en las células endoteliales vía señalización JNK-ATF2 (Cuhlmann et al. 2011).

Estos procesos se caracterizan además por estar alimentados por otros factores producidos por los propios monocitos. Todos estos acontecimientos, junto con la progresiva acumulación y proliferación de CMLV en la capa íntima a través de la vía de NF- $\kappa$ B promueven la progresión de la aterosclerosis (Bourcier et al. 1997).

#### I.4. HMGB1

Históricamente HMGB1 (*high mobility group box chromosomal protein 1*) era conocida por ser una proteína cromosómica estructural no histona. Su función consiste en estabilizar los nucleosomas a través de su unión al ADN de doble cadena facilitando así el empaquetamiento de la cromatina (Goodwin et al. 1973).

Su nombre deriva de su rápida movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. La familia de HMGB comprende tres proteínas nucleares: HMGB1, HMGB2 Y HMGB3. La estructura de estas proteínas está altamente conservada y está compuesta por tres dominios diferentes: por un lado encontramos dos secuencias homólogas de unión al ADN llamadas caja A y caja B. Cada una de ellas está constituida por 80 residuos de aminoácidos organizados en tres  $\alpha$ -hélices y se caracterizan por estar fuertemente cargadas positivamente. El tercer dominio se corresponde con el extremo c-terminal, posee una fuerte carga negativa y se compone de 30 repeticiones de residuos de ácido aspártico y glutámico. El resultado de estas dos cargas eléctricas opuestas en la misma estructura da como resultado una proteína bipolar, por lo que en un principio a HMGB1 también se la conoció como anfoterina (Andersson et al. 2002).

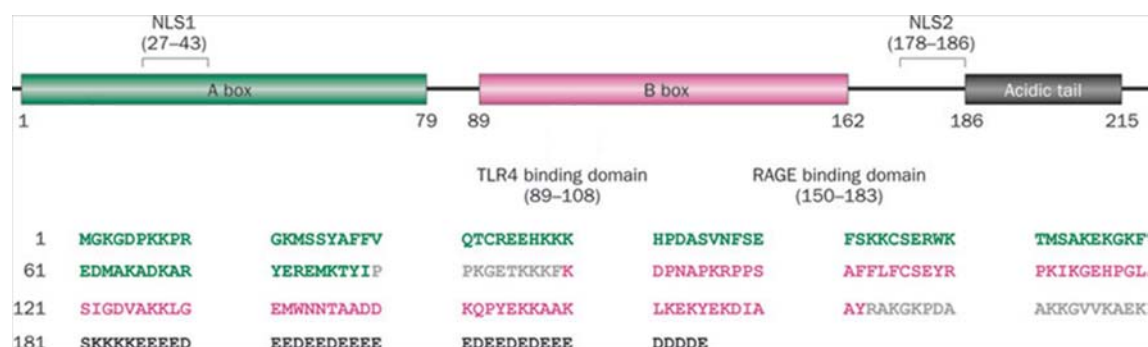


Figura 7. Estructura de HMGB1. Modificado de H. E. Harris et al. (2012)

En 1999, durante el transcurso de unos experimentos destinados a identificar mediadores tardíos de endotoxemia y sepsis, Wang y col. descubrieron que los macrófagos activados secretaban HMGB1 en un escenario de inflamación. Esta liberación de HMGB1 ocurría considerablemente más tarde que la secreción de los clásicos mediadores proinflamatorios TNF e IL-1 (Wang et al. 1999).

Se considera que HMGB1 es una citoquina porque es capaz de mediar respuestas inflamatorias sistémicas, es secretado por células activadas del sistema inmune, activa respuestas inflamatorias típicas en células del sistema inmune y células endoteliales y transduce señales celulares a través de receptores RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) (Hori et al. 1995) y Toll-like 2 y 4 (Park et al. 2004).

Existen dos vías por las que HMGB1 puede ser liberado al espacio extracelular. Una es a través de un proceso activo de secreción que ocurre tras la acetilación en el núcleo de residuos clave de lisina. Esta modificación postraducciona altera la localización nuclear y las señales de migración al citoplasma causando la concentración de la proteína en el interior de vesículas para una eventual secreción (Wang, 1999). La segunda vía es mediante un proceso pasivo en el que células necróticas (pero no apoptóticas) difunden al exterior HMGB1 biológicamente activo. HMGB1 puede ser activamente secretado por macrófagos activados, células dendríticas mieloides maduras y células “natural killer” activadas.

Al igual que ocurre con otras citoquinas, los efectos de HMGB1 extracelular están dictados por la presencia de otras citoquinas (ya sea de manera sinérgica o antagonista) y de células que expresen receptores polígamos (Lotze and Tracey 2005).

Como HMGB1 carece de péptido señal (necesario para el transporte a través de la vía canónica de secreción retículo endoplasmático-aparato de golgi), su liberación durante la activación celular se lleva a cabo mediante un proceso alternativo que depende de la localización vesicular. Durante este mecanismo, la secreción de HMGB1 se produce gracias a la fusión de las vesículas con la membrana plasmática tras una señal inflamatoria.

Las modificaciones postraduccionales de HMGB1 incluyendo acetilación, fosforilación, metilación y cambios en el estado redox de los residuos de cisteína influyen en las interacciones con el receptor y la cascada de señalización posterior a su activación (Harris et al. 2012). Por ejemplo, en el caso de la inducción de citoquinas por parte de HMGB1, la señalización a través de TLR4 es estrictamente necesaria y la activación de éste depende directamente de que HMGB1 presente la Cys106 en su forma reducida (Yang et al. 2010). Esta pequeña variación es la respuesta a las diferencias observadas en la actividad inmune de las células necróticas versus las células apoptóticas. En las células q experimentan necrosis, HMGB1 posee la forma reducida de Cys106 por lo que son capaces de iniciar el proceso inflamatorio, mientras que las que entran en apoptosis liberan HMGB1

con su Cys106 en su estado oxidado, por lo que son incapaces de estimular TLR4, impidiendo así la inducción de una respuesta inflamatoria (Kazama et al. 2008).

Se ha demostrado que HMGB1 transduce sus señales celulares interactuando a través de tres receptores: RAGE, TLR2 y TLR4. La señalización a través de estos receptores conduce a la activación de diferentes vías de señalización: factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Huttunen et al. 1999), ERK 1/2 (Ishihara et al. 2003) y p38 (Lander et al. 1997), lo cual promueve la producción de citoquinas TNF, IL-6 y IFN- $\gamma$ .

#### **I.4.1 Implicación de HMGB1 en la aterosclerosis**

En la túnica íntima de una aorta normal sólo un pequeño grupo de células entre las que se encuentran células del músculo liso vascular procedentes de la íntima, algunas células endoteliales y ocasionalmente algunos macrófagos presentes, expresan HMGB1. No obstante, este escenario cambia radicalmente cuando en lugar de analizar una pared vascular sana, analizamos una placa aterosclerótica. En 2004 Kalinina y colaboradores (Kalinina et al. 2004) descubrieron que los niveles de HMGB1 se encontraban sobreexpresados en las lesiones ateroscleróticas y que este hecho podía afectar profundamente a la función de las células anteriormente mencionadas promoviendo inflamación local, acumulación de monocitos/macrófagos e incluso el remodelado de la lesión. Dentro del proceso inflamatorio desencadenado por HMGB1 se ha observado que induce la liberación de un gran abanico de citoquinas incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (Andersson et al. 2000). Aparte de los macrófagos, los cuales representan la principal fuente de HMGB1 en las lesiones ateroscleróticas, HMGB1 también actuar sobre las células endoteliales incrementando su expresión de ICAM-1, VCAM-1 y RAGE, así como aumentar la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 y el activador tisular de plasminógeno (Fiuza et al. 2003).

Por otro lado tanto su expresión como su secreción por parte de los macrófagos se encuentran fuertemente reguladas por citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , y que su sobreexpresión y secreción tiene el poder de amplificar las respuestas inflamatorias, lo que puede dar lugar a una acumulación de macrófagos que en último término agravarían la aterogénesis (Kalinina, Agrotis, Antropova, DiVitto, Kanellakis, Kostolias, Ilyinskaya, Tararak, & Bobik 2004).

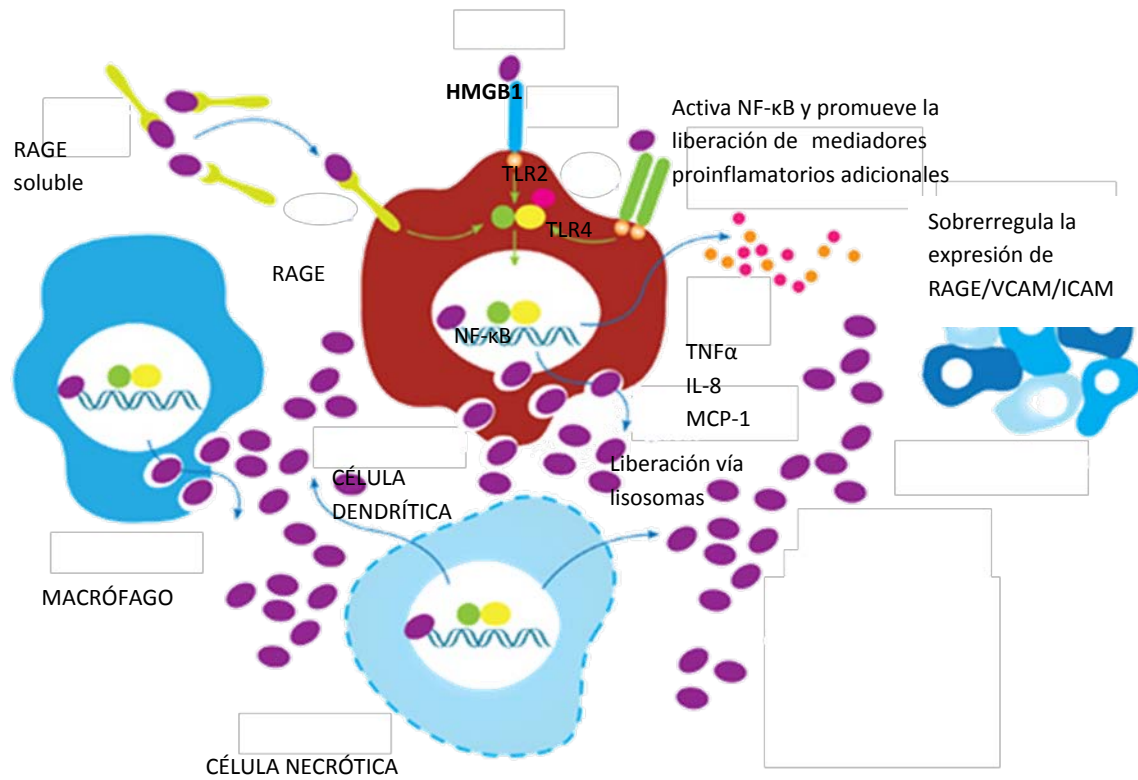


Figura 8. Representación esquemática de las acciones de HMGB1 y sus vías de liberación.

# OBJETIVOS





La enfermedad cardiovascular es la primera causa de morbilidad en los países occidentales de ahí que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas sea un tema de máxima actualidad.

Durante el desarrollo de esta tesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Estudiar la implicación de TWEAK en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Mediante la generación de un modelo experimental murino doble deficiente en ApoE y TWEAK (ApoE<sup>-/-</sup>TW<sup>-/-</sup>), analizaremos el efecto de la delección de TWEAK sobre las lesiones ateroscleróticas presentes en estos ratones. Para llevar a cabo este objetivo evaluamos el efecto de la ausencia de TWEAK tanto en lesiones ateroscleróticas tempranas (24 semanas), como en lesiones avanzadas (40 semanas).

Entre los parámetros que estudiaremos se encuentran la cantidad de lípidos, la composición celular, el grado de inflamación, la proliferación y muerte celular, la degradación del colágeno y el nivel de estabilidad de las placas avanzadas.

2.- Evaluar el efecto de la intervención terapéutica sobre el sistema TWEAK-Fn14 en el desarrollo de la placa de ateroma. A través de la inyección sistémica de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK, valoraremos el efecto terapéutico de la inhibición de TWEAK sobre la lesión aterosclerótica avanzada en ratones deficientes para el gen ApoE.

3.- Determinar el papel de TWEAK como posible modulador de la respuesta inflamatoria presente en la enfermedad aterosclerótica con especial atención a la expresión de la citoquina proinflamatoria HMGB-1.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **III.1. ESTUDIOS EN PACIENTES**

#### **III.1.1 Obtención de placas ateroscleróticas carotídeas**

Se incluyeron 25 individuos sometidos a endarterectomía carotídea en el Hospital Galdakao-Usansolo y que a su vez presentaban una estenosis carotídea asintomática (>70%) (22 hombres, 3 mujeres, 73±3 años, 52% hiperlipidémicos, 28% diabéticos, 88% hipertensos y 24% fumadores). Las placas ateroscleróticas procedían de la bifurcación de la arteria carótida y se recogieron en el momento de la cirugía. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes antes de incluirlos en el estudio. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Galdakao siguiendo todas las guías de buena práctica clínica y acorde con los principios de la declaración de Helsinki. Las placas ateroscleróticas resultantes se almacenaron en paraformaldehído durante 24 horas, luego se pasaron a etanol al 70% y finalmente se incluyeron en bloques de parafina.

#### **III.1.2 Aislamiento de monocitos humanos**

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron a partir de la fracción enriquecida en leucocitos resultante de la centrifugación de la sangre obtenida de donantes sanos mediante la solución comercial Lymphoprep (Nycomed Pharma). Los monocitos se separaron del conjunto de células mononucleares a través de una columna imantada utilizando un anticuerpo monoclonal contra un marcador específico de monocitos, en este caso CD14+, acoplado a unas pequeñas bolas magnéticas (Miltenyi Biotec). Posteriormente los monocitos ( $0.5 \times 10^6$  cells/ml) se cultivaron en medio RPMI-1640 al 5% de suero fetal bovino durante tres días en ausencia o presencia de TWEAK humano recombinante (0-0.5 µg/mL).

### **III.2. ESTUDIOS *IN VITRO***

#### **III.2.1 Reactivos**

El medio RPMI-1640, la penicilina-estreptomicina, el suero fetal bovino y la L-glutamina son de Lonza. La citoquina recombinante soluble TWEAK (r-HuTWEAK) de Millipore. El anticuerpo monoclonal anti-Fn14 (ITEM-2) lo adquirimos en Ebioscience. Los inhibidores de kinasas fueron el PD098059 (Calbiochem) y la wortmanina (Calbiochem) y utilizamos el partenolide (Sigma-Aldrich) como inhibidor de NF-κB. El anticuerpo murino monoclonal anti-TWEAK (clon P2D10) se generó en ratones TWEAK<sup>-/-</sup>. La generación de este anticuerpo bloqueante ya se ha descrito previamente (Munoz-Garcia 2009). Tanto el anti-TWEAK como la inmunoglobulina G inespecífica fueron amablemente donados por los laboratorios Biogen Idec.

#### III.2.2 Líneas celulares

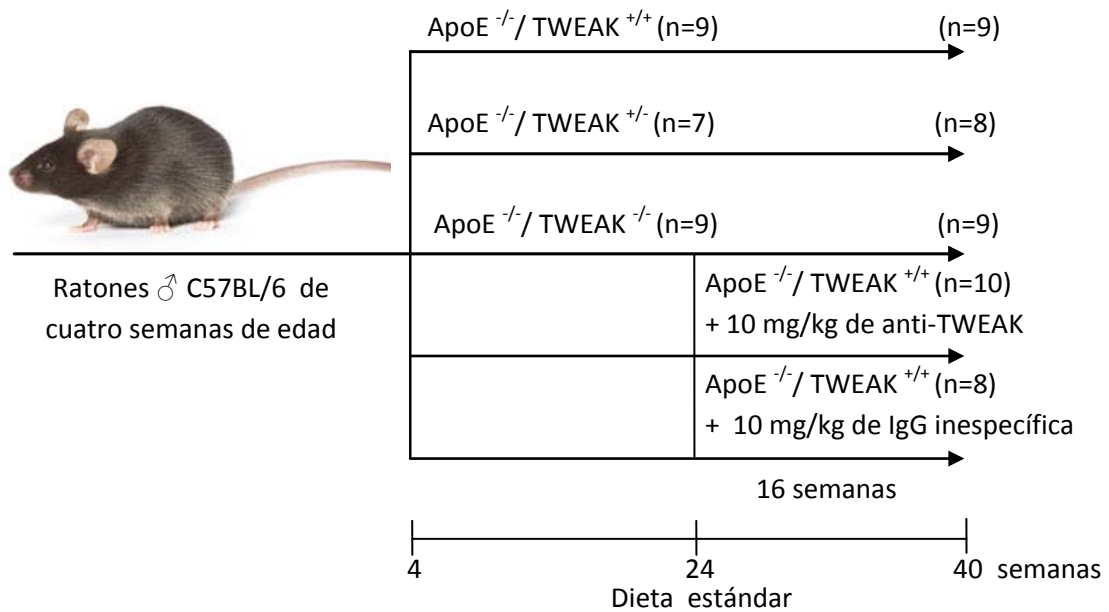
Cultivamos la línea celular monocítica THP-1 (ATCC; TIB-202) en medio RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino decomplementado, 2 mMol/L glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Para analizar la expresión de HMGB-1 en THP-1, sembramos 2·10<sup>5</sup> células/ml en medio RPMI-1640 al 0,5% de suero fetal. A continuación las estimulamos con diferentes concentraciones de TWEAK (0.25–1 µg/mL) durante 24, 48, 72 y 96 horas. En los experimentos en los que estudiamos las vías de señalización que regulan la expresión de HMGB-1, las células se pretrataron durante una o dos horas con diversos inhibidores de quinasas o de NF-κB para posteriormente estimularlas con TWEAK durante 72 horas.

#### III.3. ESTUDIOS *IN VIVO*

##### III.3.1 Modelo experimental I: Generación de ratones dobles deficientes para TWEAK y ApoE.

Hembras ApoE<sup>-/-</sup> (#002052; Jackson Laboratory) fueron cruzadas con machos TWEAK<sup>-/-</sup> (suministrados por Biogen Idec Cambridge, E.E.U.U.) (ambos con fondo genético C57BL/6). La progenie resultante se cruzó con hembras ApoE<sup>-/-</sup> durante siete generaciones, seguido de un entrecruzamiento con el fin de obtener los dobles deficientes (TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>), sus controles equivalentes (TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) y los ratones heterocigotos para TWEAK (TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>).

Los ratones macho fueron alimentados con dieta estándar durante todo el tiempo de estudio. Para estudiar el efecto de la delección de TWEAK en lesiones ateroscleróticas tempranas, ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9), TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=7) y TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9) se sacrificaron a las 24 semanas de edad.



**Figura 9.** Representación esquemática del modelo animal utilizado para analizar el papel de TWEAK endógeno en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas tempranas y avanzadas. Se incluye también la parte del modelo correspondiente al tratamiento con el anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK.

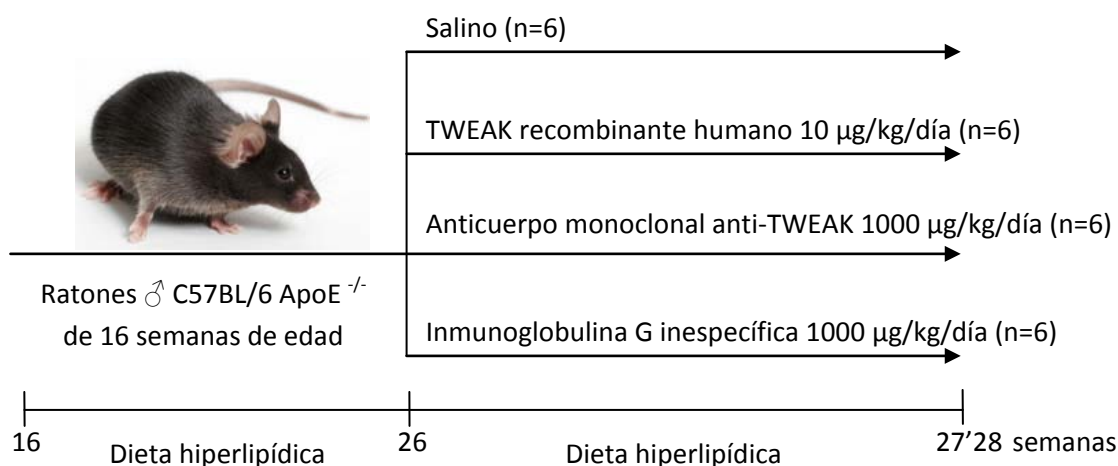
Para estudiar el efecto del tratamiento terapéutico del anticuerpo anti-TWEAK en lesiones ateroscleróticas avanzadas, 27 ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> de 24 semanas de edad fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos: ratones inyectados con salino (N=9), ratones inyectados con 10 mg/kg del anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK dos veces a la semana (N=10) y ratones inyectados con 10 mg/kg de una inmunoglobulina G control dos veces a la semana (N=8). El tratamiento para estos tres grupos tuvo una duración de 16 semanas. Además, se incluyeron en el estudio dos grupos más: TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (n=8) y TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (n=9) con el fin de analizar el efecto de la delección total del gen TWEAK, en el caso de los dobles deficientes, o parcial en el caso de los heterocigotos. Todos los ratones (N=44) se sacrificaron a las 40 semanas de edad.

El anticuerpo monoclonal murino anti-TWEAK (clon P2D10) se generó en ratones deficientes para TWEAK y fue cedido por Biogen Idec. Todos los animales se mantuvieron enjaulados con agua y dieta normal *ad libitum*. Los niveles séricos de colesterol se testaron con un kit de Thermo Trance; mientras que las concentraciones en suero de HDL, LDL/VLDL y triglicéridos se midieron con un kit de HDL/LDL/VLDL/colesterol y un kit de cuantificación de triglicéridos respectivamente (ABCAM). Todos

estos estudios fueron realizados acorde con las directrices de la Unión Europea y fueron aprobados por el comité ético del IIS-FJD.

#### III.3.2 Modelo experimental II: Inyección sistémica de TWEAK

24 ratones ApoE<sup>-/-</sup> de 16 semanas de edad fueron alimentados durante 10 semanas con dieta hiperlipídica [21,2% grasa (0,15% colesterol) + 16,7% proteínas]. Posteriormente se aleatorizaron en cuatro grupos: grupo control (n=6) tratado con 100 µl/día de suero salino intraperitoneal; ratones a los que se les inyectó TWEAK humano recombinante a razón de 10 µg/kg/día (n=6); ratones tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TWEAK (1000 µg/kg/día, n=6) y finalmente ratones tratados con una inmunoglobulina G inespecífica (1000 µg/kg/día, n=6). Las inyecciones intraperitoneales de salino, TWEAK, anti-TWEAK o IgG se realizaron diariamente y el tratamiento tuvo una duración de nueve días.



**Figura 10.** Representación esquemática del modelo animal utilizado para analizar el papel de TWEAK exógeno en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas avanzadas. Se incluye también la parte del modelo correspondiente al tratamiento con el anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK.

La dosis de TWEAK la escogimos basándonos en estudios previos *in vivo* (Campbell, Burkly, Gao, Berman, Su, Browning, Zheng, Schiffer, Michaelson, & Putterman 2006) y la dosis del anticuerpo anti-TWEAK fue cien veces superior a la de la dosis de la proteína recombinante. Los animales fueron manipulados según la normativa de CEE (BOE 223/1988 y 265/1990). En el momento del sacrificio, los animales sometidos a ayuno se anestesiaron y se tomaron muestras de sangre a partir del plexo orbital, tras lo cual se expuso la cavidad abdominal y se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo



para la perfusión con suero salino, realizándose una punción de escape en la arteria femoral. Posteriormente se extirpó la aorta desde el corazón a la bifurcación de las ilíacas y se dividió en dos partes: la región cercana al corazón se incluyó en Tissu-tek OCT (Sakura) para su posterior estudio histológico y la otra parte se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. El estudio se realizó siguiendo las directrices de la Unión Europea y fue aprobado por el comité ético del IIS-FJD.

### **III.4 TÉCNICAS UTILIZADAS**

#### **III.4.1 Análisis histológicos**

##### **III.4.1.1 Tinción de aorta completa**

Las lesiones se cuantificaron siguiendo un método de tinción denominado “en face” (de momento no existe una nomenclatura equivalente en español) que consiste en teñir la totalidad de la aorta. Para realizar el protocolo “en face” después de limpiar cuidadosamente la grasa y los músculos que rodean la aorta, la abrimos longitudinalmente desde el cayado aórtico hasta las arterias ilíacas. Posteriormente la trasladamos a una bandeja de disección cubierta de parafina blanca solidificada donde se inmovilizó con alfileres de acero inoxidable de 0,2 mm de diámetro. Después de fijarla durante la noche con paraformaldehído al 4% y hacerle un lavado en PBS, la aorta se sumergió durante 6 minutos en una solución filtrada que contenía 0,5% Sudán IV, 35% de etanol, y 50% de acetona. Finalmente se destiñó en etanol al 80%. Las aortas teñidas se fotografiaron y se utilizaron para la cuantificación de las lesiones ateroscleróticas totales.

##### **III.4.1.2 Análisis morfométrico del seno aórtico y la arteria braquiocefálica**

Para realizar este análisis primero diseccionamos cuidadosamente la arteria braquiocefálica y la parte superior del corazón y los congelamos en OCT. Las válvulas aórticas se cortaron en secciones de 5 micras empezando por el punto del corazón en donde se observa por primera vez la presencia de las válvulas en el sitio de unión a la aorta. Los cortes resultantes se tiñeron con oil-red-o (Sigma-Aldrich) y hematoxilina (Dako) a intervalos de 100 micras desde el punto 0 hasta llegar a las 1000 micras del punto de inicio. Calculamos el área de máxima lesión de cada ratón a partir de la media de los tres cortes con mayor lesión, y las áreas de máxima lesión individual se promediaron para determinar el área de máxima lesión para cada grupo. Para valorar la cantidad de colágeno presente en las placas, teñimos los arcos con rojo pricosirio (Sigma-Aldrich) y medimos la birrefringencia a la luz polarizada.

Las arterias braquiocefálicas se cortaron en secciones seriadas de 5 micras de espesor desde el cayado de la aorta hasta la arteria subclavia derecha. Para el análisis morfométrico, los cortes

procedentes de cada arteria braquiocefálica se tiñeron siguiendo el protocolo pentacrómico de Movat (Electron Microscopy Sciences) en intervalos de 90 micras de una longitud total aproximada de 450 micras. Para analizar la frecuencia de los marcadores de inestabilidad de la placa presentes en cada corte teñido con Movat se tuvieron en cuenta 5 portaobjetos por animal (40-50 portaobjetos por grupo) en los que se midió la presencia o ausencia de: capa fibrótica fina, núcleo necrótico, hemorragia intraplaca, erosión y engrosamiento de la túnica media, xantomas laterales y presencia de cápsulas enterradas (signo de una ruptura de placa silenciosa). Estos parámetros se tradujeron a valores binarios (1= presencia, 0= ausencia) y la frecuencia por lesión para cada animal se determinó con un máximo posible de 100%. La calcificación de las placas de la arteria braquiocefálica se examinó a partir de la cuantificación de la tinción Von Kossa (Polysciences).

#### III.4.1.3 Análisis inmunohistoquímico

Las muestras incluidas en parafina procedentes de las placas carotídeas fueron cortadas en piezas de 4 µm de grosor, desparafinadas y rehidratadas. En el caso de las muestras incluidas en OCT, se fijaron con acetona fría durante 10 minutos.

La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió sumergiendo los cortes en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol-agua (1:1) durante 30 min y posteriormente se incubaron con PBS al 6% de albúmina de suero bovino durante una hora a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios biotinilados se aplicaron durante una hora a una dilución 1:200 en PBS al 6% albúmina de suero bovino. Después se incubaron las muestras con el complejo ABCComplej/HRP (Vector Laboratories) durante 30 min. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Dako) durante 3-10 minutos. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina (Dako). Los cortes procedentes de parafina se deshidrataron y montaron en DPX (British Drug House), mientras que los de OCT se montaron directamente con gelatina glicerilada Kaiser (Merck). En cada experimento se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario para comprobar que no existía tinción inespecífica.

Los anticuerpos primarios fueron: el marcador de macrófagos Mac-3 (M3/84; BD Pharmingen), el marcador de células espumosas adipofilina (GP41; Progen Biotechnik), el marcador de músculo liso alfa-actina (Clone 1A4; Sigma), las quimioquinas MCP-1 (sc-1785; Santa Cruz Biotechnology) y RANTES (AB2109P, Chemicon), el marcador de glóbulos rojos TER-119 (sc-19592, Santa Cruz Biotechnology), el marcador de proliferación PCNA (sc-7907, Santa Cruz Biotechnology) y anti-HMGB-1 (ab18256, Abcam), anti-TWEAK (AF1199, R&D Systems), anti-Fn14 (4403, Cell Signaling

Technology), anti-CD68 (EBM11, Dako) anti-CD163 (MCA1853, Serotec) y anti-alfa actina (1A4, Dako).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron el anti-cabra biotinilado hecho en burro, el anti-conejo biotinilado hecho en burro, el anti-rata biotinilado hecho en cabra (Amersham) y el anti-cobaya biotinilado hecho en cabra (Abcam). Posteriormente se añadió el ABComplex/HRP (Vector Laboratories) durante media hora para después revelar con 3,3-diaminobenzidina (Dako), contrastar con hematoxilina (Dako) y montar con resina glicerilada Kaiser (Merck). Como control negativo incubamos los cortes con PBS/BSA en lugar del anticuerpo primario.

La apoptosis en la región de las válvulas aórticas se analizó mediante el método TUNEL siguiendo las instrucciones del fabricante (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Millipore Ibérica).

Anticuerpo primario	Especie	Bloqueo	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
(P) Mac-3, clon M3/84; BD Pharmingen	Ratón	2% oveja	1:10	Anti-rata biotinilado, Santa Cruz Biotechnology	1:200
(P) Adipofilina, GP41; Progen Biotechnik	Ratón	2% oveja	1:50	Anti-cobaya biotinilado, Abcam	1:200
(M) $\alpha$ -actina-FITC Clone 1A4; Sigma	Ratón	Sin suero	1:100	-----	-----
(P) MCP-1 sc-1785; Santa Cruz Biotechnology	Ratón	8% caballo	1:30	Anti-cabra biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) RANTES AB2109P, Chemicon	Ratón	8% caballo	1:100	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) PCNA, sc-7907, Santa Cruz	Ratón	10% caballo	1:50	Anti-conejo HRP, GE Healthcare	1:200
(M) TER-119, sc-19592, Santa Cruz	Ratón	10% caballo	1:100	Anti-rata, Alexa Fluor® 488, Invitrogen	1:500
(P) HMGB-1, ab18256, Abcam	Humano	6% caballo	1:200 IHQ/ 1:500 WB/ 1:100 IF	Anti-conejo biotinilado / anti-conejo HRP, GE Healthcare/ anti-conejo-FITC, Sigma	1:200/ 1:200/ 1:2000

(P) TWEAK, AF1199, R&D Systems	Humano	6% caballo	1:1000	Anti-cabra biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) Fn14 #4403 Cell Signaling Technology	Humano	6% caballo	1:200	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) CD68, Clon EBM11, Dako	Humano	6% oveja	1:100	Anti-ratón biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) CD163, MCA1853, Serotec	Humano	6% oveja	1:1000	Anti-ratón biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) $\alpha$ -actina, 1A4, Dako	Humano	6% oveja	1:100	Anti-ratón biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) $\alpha$ -tubulina, T5168, clon B-5-1-2, Sigma	humano	6% caballo	1:5000	Anti-ratón HRP, GE Healthcare	1:2500

**Figura 11. Listado de anticuerpos utilizados.** Entre paréntesis se indica si el anticuerpo es monoclonal (M) o policlonal (P).

#### III.4.1.3.1 Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas

Los análisis morfométricos asistidos por ordenador se realizaron con el software Image-Pro Plus (version 1.0 para windows). El umbral para la medición del área teñida fue el mismo para todas las imágenes. Las muestras de cada ratón se examinaron de forma ciega. Los resultados de lípidos, colágeno, MCP-1 y RANTES se expresaron como porcentaje de área positiva respecto al área total; y para MAC-3, adipofilina, alfa-actina, PCNA y TUNEL como células positivas por milímetro cuadrado en el caso de las inmunohistoquímicas.

#### III.4.1.4 SouthWestern

Esta técnica se desarrolló en nuestro laboratorio para detectar in situ la activación de factores de transcripción (Hernandez-Presa et al. 1999). El primer paso fue utilizar una trasferrasa 3'-terminal (Roche) para marcar con digoxigenina un oligonucleótido consenso para NF- $\kappa$ B procedente del promotor de RANTES (5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3') (Promega). Las secciones de tejido embebidas en OCT se fijaron en paraformaldehído al 0,5% y después se trataron secuencialmente con 5mM de levamisol en PBS y 0,1 mg/mL de DNasa I (Roche). La unión al ADN se realizó mediante la incubación con 50 pmol de sonda de ADN marcada en un buffer con 0.25% de albúmina de suero bovino y 1 g/ml de poly (dI-dC). Posteriormente las secciones se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato NBT/BCIP (Roche). La detección colorimétrica se realizó según el protocolo. Como control negativo se utilizaron secciones incubadas

sin sonda y se utilizó un exceso de sonda sin marcar para testar la especificidad de la técnica. Los resultados se expresan como el porcentaje del área positiva versus el área total.

#### III.4.1.5 Zimografía *in situ*

Para estimar la actividad de la gelatinasa de las metaloproteinasas *in situ*, incubamos cortes de 5 micras usando gelatina conjugada con fluoresceína inactivada llamada DQ-gelatina (Invitrogen, Life Technologies) como sustrato. Este tipo de gelatina requiere la digestión proteolítica de las metaloproteinasas para emitir fluorescencia y ésta en concreto se caracteriza porque sólo es reconocida por dos gelatinasas: MMP-2 y MMP-9. Para llevar a cabo este protocolo se mezcló una proporción 1:10 de gelatina DQ (1mg/ml en H<sub>2</sub>O) con una agarosa de baja temperatura de gelificación (Lonza). La mezcla resultante (30 µl) se dispuso encima de cada corte, se tapó y se dejó gelificar a 4° C. Tras 24 horas de incubación a 37° C, las muestras se examinaron con un microscopio confocal de fluorescencia (Leica). Las imágenes zimográficas se adquirieron usando las mismas condiciones de obturador. Finalmente se midió la media de la intensidad de fluorescencia de cada corte, excluyendo la autofluorescencia propia de los filamentos de la elástica media. La especificidad de la actividad de la gelatinasa se determinó incubando la gelatina DQ durante 24 horas en presencia de los inhibidores de metaloproteinasas de amplio espectro ilomastat (10 µmol/L) (GM6001, Chemicon) y fenantrolina (0.5 mmol/L) (Sigma-Aldrich).

#### III.4.1.6 Inmunofluorescencia

Para los estudios de inmunofluorescencia, las células THP-1 se sembraron en portaobjetos de poliestireno de cuatro cámaras Lab-Tek™ sistema Chamber Slide™, se fijaron en paraformaldehído al 4% y después se permeabilizaron en tritón X-100/PBS al 2%. Posteriormente se lavaron en PBS y se incubaron con anti-HMGB-1 seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato fluorescente. A continuación se contrastaron los núcleos con yoduro de propidio (Sigma-Aldrich). Finalmente se desmontaron las cámaras y se montó con FluorSave (Calbiochem)

#### III.4.2 Análisis de ARN: Extracción de ARN y PCR en tiempo real.

El ARN total procedente de las aortas de los ratones y de las células THP-1 se extrajo siguiendo las instrucciones de uso del reactivo Trizol (Invitrogen, Life Technologies). La cuantificación del ARN se realizó por medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/ml de ARN. Se comprobó que la relación entre las absorbancias 260 y 280 nm era cercana a 2, indicando que el ARN procesado es puro y no está

contaminado por proteínas. La transcripción inversa se realizó con 2 µg de ARN total durante 2 horas a 37°C utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Life Technologies).

La PCR a tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial Taqman ABI 7700 usando una TaqDNA polimerasa activada por temperatura (Amplitaq Gold). Los cebadores y sondas Taqman utilizados se compraron a Applied Biosystems y se optimizaron según las instrucciones del fabricante: 18S, TWEAK (Mm00839900\_m1), MCP-1 (Mm00441242\_m1) y RANTES (Mm01302428\_m1). Después de un periodo inicial de 2 minutos a 50°C y de 10 minutos a 95°C, las muestras pasaron por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizó la amplificación del ARN del 18S en paralelo junto con el gen de interés, para utilizarlo como control interno. Todas las medidas se realizaron por duplicado. La cantidad de ARNm diana se estimó mediante el método de cuantificación  $2^{-\Delta CT}$  utilizando el programa de Applied Biosystems Sequence Detection Software versión 1.4.

Para cuantificar la cantidad de ARN mensajero de HMGB-1, encargamos a Eurofins MWG Operon el diseño del cebador (TGGCTCCCGCTCTCACAGCCAT forward, AGTGCCCGTCCGGCTCTCACTT reverse). Para la amplificación del ADN copia usamos la mezcla SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Biotechnology) según las instrucciones del fabricante y siguiendo un programa de tres pasos: (2 minutos a 50°C; 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 94°C; 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C) más un paso extra de disociación de cebadores (15 segundos a 98°C). La utilización de controles y el análisis de datos se realizaron de la misma forma que con los cebadores de Applied Biosystems.

#### III.4.3 Análisis de proteínas

##### III.4.3.1 Array proteico

Medimos las concentraciones de 20 citoquinas solubles en plasma: IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-gamma, KC, MCP-1, M-CSF, RANTES, TNF alpha y VEGF-A, mediante un array proteico según las instrucciones del fabricante (Quantibody Mouse Cytokine Array 1, RayBiotech, Inc.). La lectura de la señal se realizó con un escáner equipado con un sistema de excitación Cy3 y emisión de longitud de onda (555/565 nm) (GenePix Professional 4200A). El mismo software del escáner se usó para extracción de los datos y su posterior análisis.

#### III.4.3.2 Western blot

Las proteínas procedentes de la aorta pulverizada y de las células se extrajeron empleando 50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 mM NaF, 0,2% Tritón X-100, 0,3% NP-40, 0,1 mM PMSF.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método del BCA (Thermo Scientific). Los lisados totales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS al 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) en 25 mM Tris pH=8.3, 150 mM glicina y 20% vol/vol metanol y se bloquearon con 5% leche en polvo desnatada en PBS Tween 0,5% durante una hora.

A continuación se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios durante 16 horas a 4°C. Tras sucesivos lavados para eliminar el exceso de anticuerpo, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Amersham), detectando la proteína mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL y exposición a películas de rayos X (Amersham). Como control de carga interno, se determinaron los niveles de alfa-tubulina (T5168, Sigma) en todas las membranas utilizadas. La cuantificación se expresa como unidades densitométricas arbitrarias (UDA).

#### III.4.3.3 ELISA

Los sobrenadantes de los monocitos THP-1 estimulados con TWEAK a diferentes tiempos y dosis se utilizaron para hacer un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* / ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) específico para la quimioquina MCP-1. Utilizando un kit de ELISA para MCP-1 (R&D) tomamos 100 µl de cada punto del experimento y realizamos el ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### III.4.4 Transfección con ARN pequeño de interferencia

Las células THP-1 fueron transfectadas utilizando el Amaxa® Cell Line Nucleofector® kit V (Lonza), seleccionando el programa V-001 tal y como indican las instrucciones del fabricante. Los ARN pequeños de interferencia de HMGB-1 y control se adquirieron a Invitrogen. Para alcanzar la máxima eficiencia en la transfección, esta se hizo 72 horas antes de añadir el TWEAK recombinante.

#### III.4.5 Cuantificación

Un patólogo que desconocía la naturaleza de las muestras llevó a cabo un análisis morfométrico asistido por ordenador utilizando el programa de análisis de imágenes Micro Image software (versión 1.0 para Windows). Los resultados se expresan como % tinción positiva/area para las placas humanas.

#### III.4.6 Estadística

El análisis estadístico se realizó usando el software estadístico SPSS 11.0. Los datos se expresan mayoritariamente como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) excepto en la estadística referente a los experimentos in vitro en donde se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). Las diferencias entre grupos se determinaron usando un test ANOVA de dos colas en el caso de tres o más grupos, o un test de Student cuando sólo hay dos grupos. Se estableció un valor máximo de probabilidad del 0.05 para ser estadísticamente significativo. Los experimentos in vitro se realizaron como mínimo tres veces. La asociación univariante se realizó mediante la prueba de correlación de Pearson.



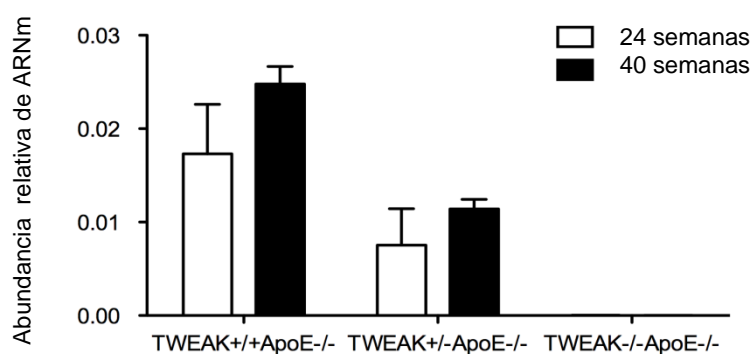
# RESULTADOS



## Parte I: LA INHIBICIÓN DE TWEAK, YA SEA POR DELECCIÓN GÉNICA O MEDIANTE UN ANTICUERPO BLOQUEANTE, REDUCE LA CARGA ATEROSCLERÓTICA Y MEJORA LA ESTABILIDAD DE LA PLACA EN LOS RATONES DEFICIENTES PARA EL GEN APOE

### IV.I.1 La delección de TWEAK reduce el tamaño de e incrementa el cociente colágeno/lípidos en las placas ateroscleróticas presentes en el seno aórtico

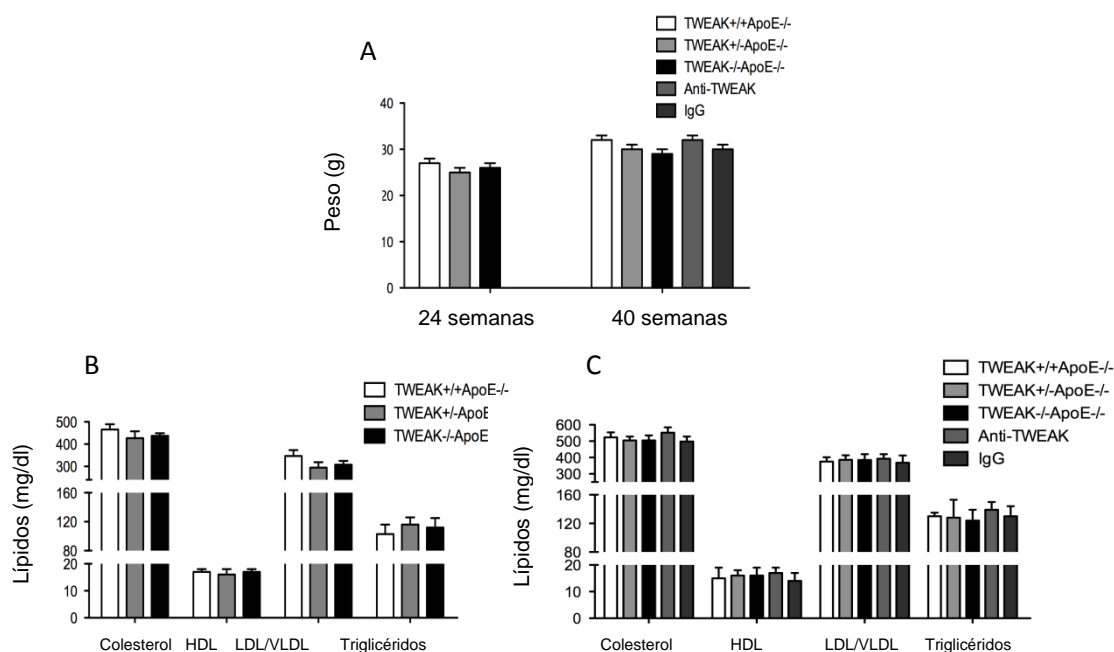
Antes de proceder al análisis de los resultados obtenidos en el estudio experimental es necesario aclarar algunas características del modelo utilizado. Los ratones heterocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE expresaron alrededor de un 40-50% menos de ARN mensajero de TWEAK que los homocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE (a partir de ahora denominados control) (Figura 12).



**Figura 12. Análisis de PCR a tiempo real de la expresión de ARN mensajero de TWEAK procedente de aorta total de los diferentes genotipos de ratón utilizados en el estudio tanto de 24 como de 40 semanas de edad.**

Resultados expresados como media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo.

Asimismo no se observaron diferencias significativas en los parámetros metabólicos como el peso corporal o los niveles de lípidos entre los diferentes grupos (figura 13)

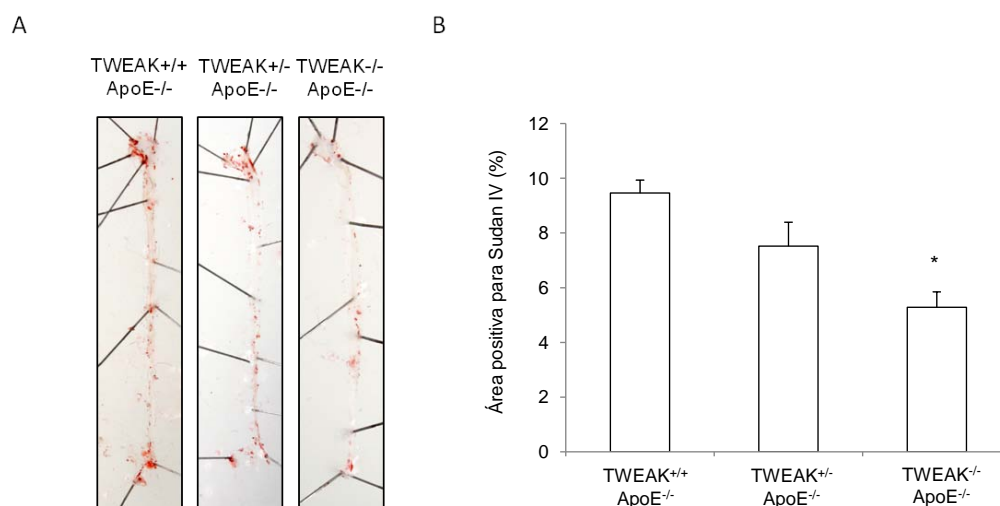


**Figura 13. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK no altera los parámetros metabólicos.**

A) Peso corporal y B) niveles plasmáticos de colesterol, LDL/VLDL, HDL y triglicéridos de los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> y TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> de 24 semanas y C) de los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> y TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> tratados con anti-TWEAK o IgG control de 40 semanas. Resultados expresados como media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo.

Para determinar el papel de TWEAK en las lesiones ateroscleróticas, ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE (TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>), heterocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE (TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) y homocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE (TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) fueron alimentados con dieta estándar y separados en dos grupos. Uno de ellos se sacrificó a las 24 semanas con el objetivo de estudiar las lesiones ateroscleróticas tempranas, y el otro se sacrificó a las 40 semanas para poder estudiar las lesiones vasculares avanzadas.

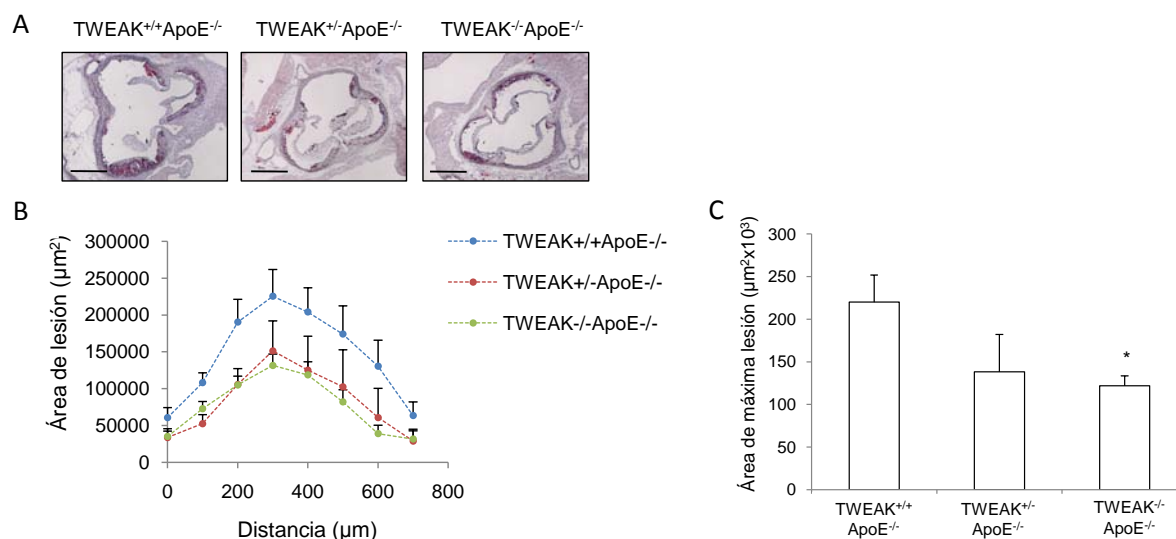
En primer lugar analizamos a las 24 semanas las lesiones presentes a lo largo de toda la aorta tiñéndola con el colorante sudán IV (Figura 14). Observamos un 44% menos de lesiones en los dobles deficientes respecto a los ratones control ( $p < 0.05$ ), y un 20% si los comparamos con los heterocigotos, si bien esta última reducción no alcanzó significancia estadística.



**Figura 14. La delección de TWEAK disminuye la carga ateroesclerótica aórtica en los ratones deficientes para ApoE de 24 semanas.**

A) Tinción representativa con Sudan IV y B) su correspondiente cuantificación de la aorta completa en ratones deficientes para ApoE de 24 semanas de edad. \*  $p=0.005$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>.

Posteriormente estudiamos la presencia de aterosclerosis en los senos aórticos de esos mismos ratones. Los ratones TWEAK<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mostraron una reducción significativa del tamaño de la lesión en el seno aórtico comparado con los ratones control TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> (-45% en el punto de máxima lesión,  $p=0.01$ ), mientras que la reducción del 37% observada en los ratones heterocigotos no alcanzó significancia estadística (Figura 15).



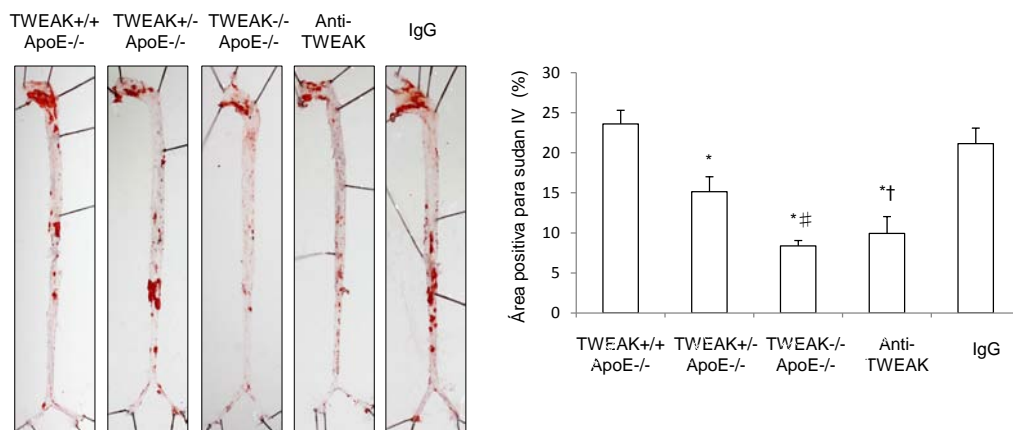
**Figura 15. La delección de TWEAK disminuye el daño vascular en ratones deficientes para ApoE de 24 semanas.**

A) Tinción representativa con Oil-Red-O/Hematoxilina del seno aórtico de ratones de 24 semanas. Escala 200 μm.

B) Cuantificación del área de la lesión a lo largo del seno aórtico.

C) Media de la máxima lesión por grupo. Resultados expresados como media ± EEM de todos los animales incluidos en cada grupo \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>.

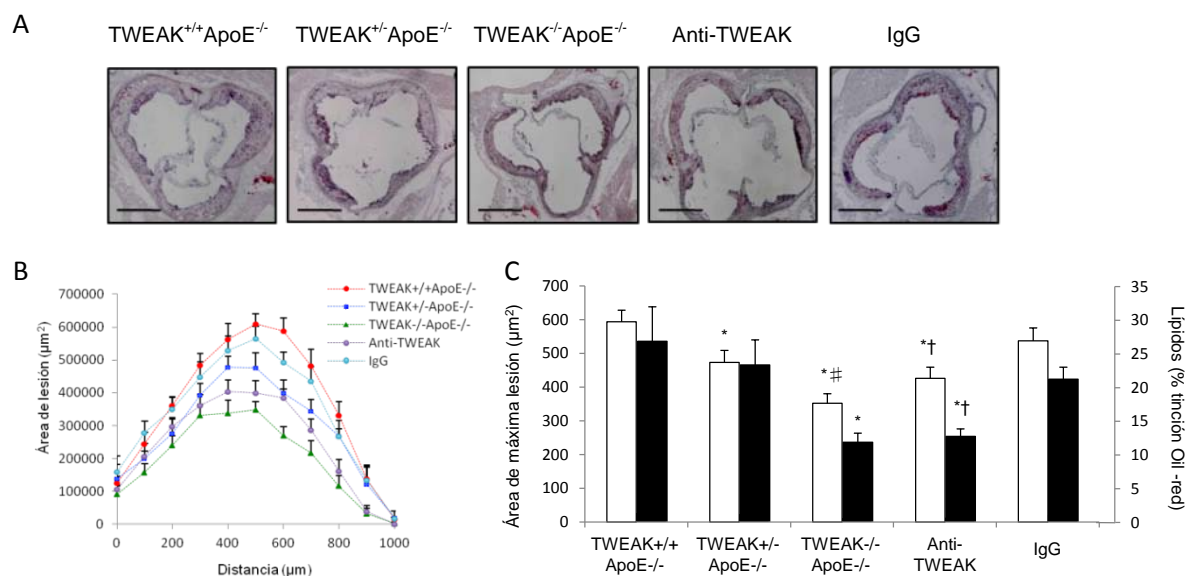
Al igual que en el caso de las lesiones tempranas, en los ratones de cuarenta semanas también analizamos la aorta completa con un colorante lipofílico (Figura 16) obteniendo en este caso un descenso en el número y tamaño de las lesiones de un 64% entre los dobles delecionados y los control ( $P<0.001$ ); y de un 36% ( $p=0.015$ ) entre los ratones heterocigotos y los control.



**Figura 16. La deleción de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK reduce la carga aterosclerótica en los ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

Preparaciones de aorta completa teñida con Sudán IV y gráfico de la cuantificación de las lesiones avanzadas de los ratones deficientes para ApoE. \*  $p<0.01$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p=0.01$  vs TWEAK<sup>+/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p=0.007$  vs control IgG.

En las lesiones avanzadas, tanto los ratones TWEAK<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> como los TWEAK<sup>+/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mostraron una reducción significativa en el tamaño de la lesión presente en el seno aórtico comparados con los ratones control TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> (41% y 21% de reducción,  $p<0.001$ ;  $p=0.03$  respectivamente) (Figura 17).



**Figura 17. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK reduce el daño vascular en ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

A) Fotografías de tinción representativa con Oil-Red-O/Hematoxilina

B) cuantificación del área de la lesión en el seno aórtico de los ratones de 40 semanas. Escala 200 μm.

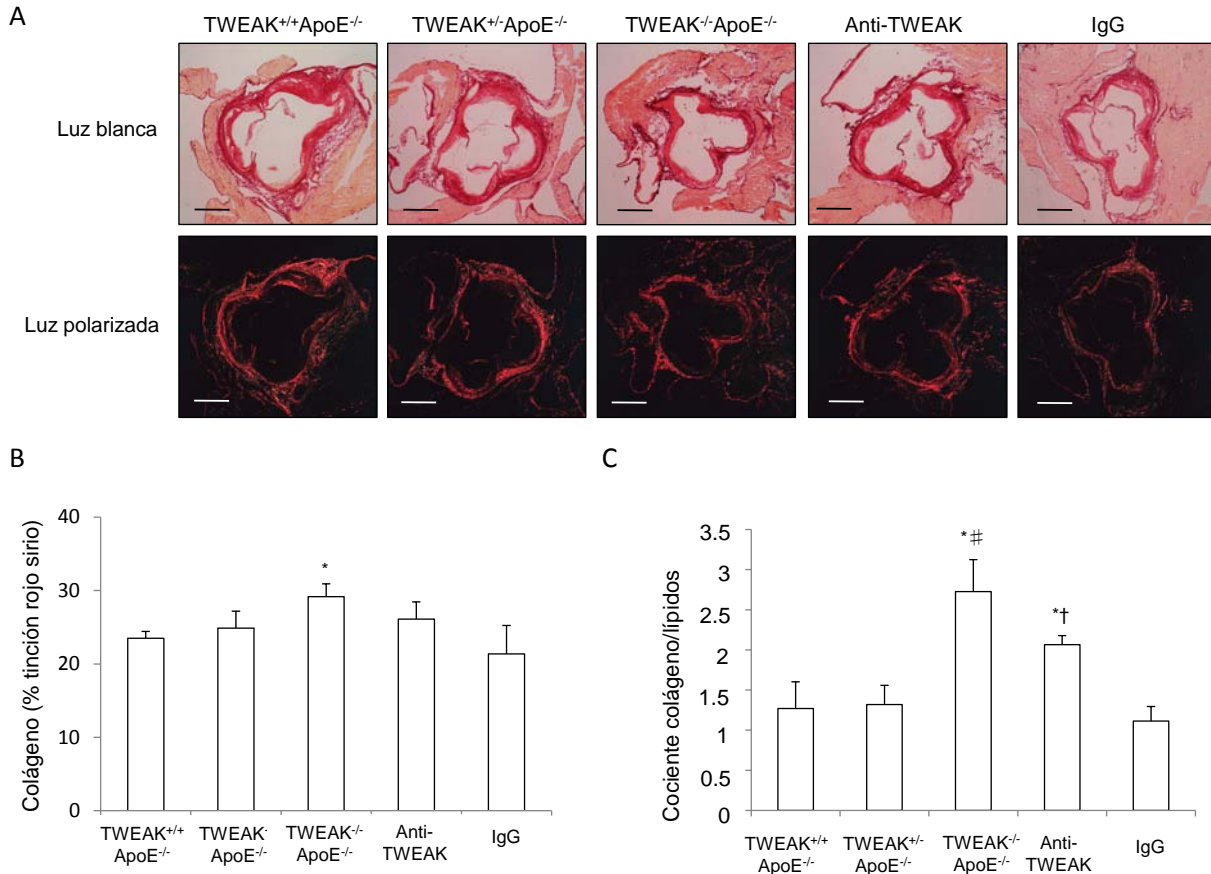
C) Media de la máxima lesión por grupo y la cantidad de lípidos procedente de la cuantificación del Oil red-O. Resultados expresados como media ± EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.05$  vs control IgG.

Mientras los lípidos hacen que las placas ateroscleróticas sean más propensas a la rotura, las fibras de colágeno las estabilizan (Rekhter 2002). Con el fin de caracterizar la estabilidad de las placas ateroscleróticas, evaluamos el contenido de lípidos y de colágeno en lesiones tempranas y avanzadas. El contenido en lípidos se define como el porcentaje de área teñida con Oil red-O respecto al área total de la placa. En lesiones tempranas, los TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> pero no los TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mostraron una tendencia a la disminución en el contenido de lípidos comparado con los controles (26.6±1.9 y 33.4±6.1 vs 31.3±3.6 % de área teñida con Oil red-O) si bien, no llegó a tener significancia estadística. Como se ha mencionado anteriormente, el contenido de colágeno dentro de la lesión posee un importante papel estructural en la estabilidad de la placa aterosclerótica. En las lesiones tempranas, tanto TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> como TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mostraron una tendencia hacia el incremento en el contenido de colágeno dentro de la placa, si bien este aumento no fue significativo respecto a TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (11.7±2.2 y 9.6±2.2 vs 6.7±2; % área positiva para rojo sirio; respectivamente) (no mostrado).

En el caso de las lesiones avanzadas (Figura 18), los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> sí mostraron una reducción significativa del contenido de lípidos en comparación con TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> ( $p = 0.02$ ).

## IV Resultados

Además, el contenido de colágeno en  $\text{TWEAK}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$  resultó incrementado si lo comparamos con los ratones  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$  ( $p=0.01$ ). Como consecuencia, el cociente colágeno/lípidos aumentó en los ratones  $\text{TWEAK}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$  de 40 semanas comparados con el grupo control.



**Figura 18. La delección de TWEAK aumenta el contenido de colágeno en el seno aórtico de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

A) Fotografías mostrando preparaciones de seno aórtico de ratón deficiente para ApoE de 40 semanas teñidas con rojo sirio. Escala: 200  $\mu\text{m}$ .

B) Cuantificación del protocolo de tinción rojo sirio de los senos aórticos. Resultados expresados como media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p<0.05$  vs  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$ .

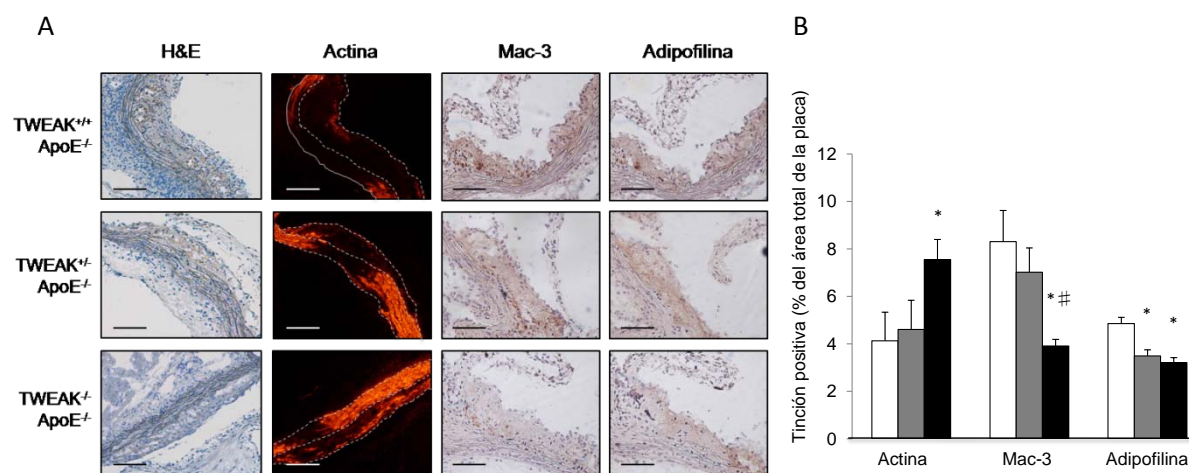
C) Gráfico representando el cociente colágeno/lípido. \*  $p=0.001$  vs  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$ ; #  $p=0.009$  vs  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$ ; †  $p<0.001$  vs control IgG.



### IV.1.2 La delección de TWEAK reduce el número de macrófagos y células espumosas e incrementa el número de células del músculo liso vascular en el seno aórtico.

Debido a que la inflamación tiene un gran impacto en la vulnerabilidad de la placa (Stoll and Bendszus 2006), quisimos examinar el componente inflamatorio en el seno aórtico de nuestro modelo experimental. En el caso de las lesiones tempranas, los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mostraron una disminución del 53% en el contenido de macrófagos (Mac-3) y de un 34% en las células espumosas (adipofilina) cuando los comparamos con los ratones control (p=0.004 y p<0.001; respectivamente) (Figura 19).

Ambos parámetros también se vieron reducidos en los ratones heterocigotos comparados con los ratones control, pero sólo las células espumosas fueron estadísticamente significativas (p=0.005). Además, los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> presentaron un incremento del 82% en el número total de CMLV ( $\alpha$ -actina del músculo liso) comparados con los TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (p=0.03).

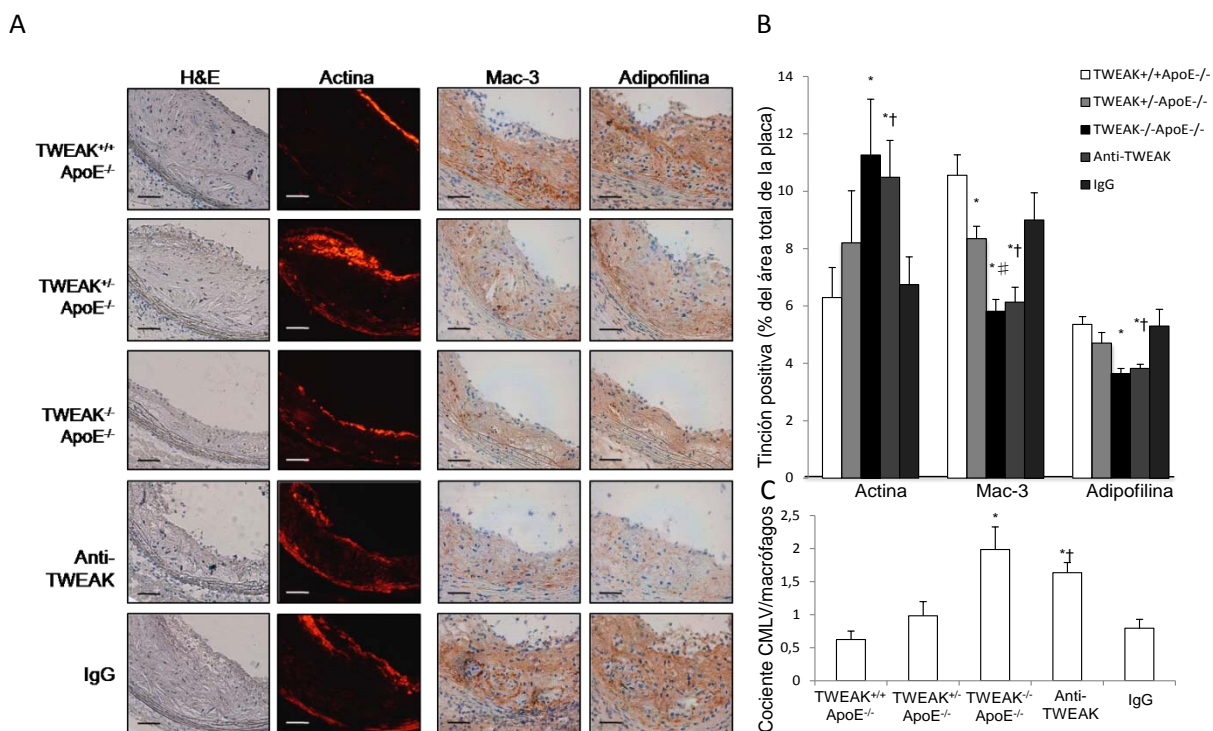


**Figura 19. La delección de TWEAK disminuyó el número total de macrófagos y células espumosas e incrementó el contenido en células del músculo liso vascular en las lesiones tempranas procedentes de ratones deficientes para ApoE.**

A) Fotografías representativas y B) cuantificación de las áreas teñidas positivas para alfa-actina, Mac-3 y adipofilina en las placas ateroscleróticas presentes en los senos aórticos de los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9), TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=7) y TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9) de 24 semanas. Resultados expresados como media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \* p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; # p<0.05 vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

Resultados similares se observaron en las lesiones avanzadas ya que las lesiones ateroscleróticas de los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> muestran una reducción del 46% en el contenido de macrófagos y de un 32% en el de las células espumosas comparados con el grupo control (p<0.001 para ambos tipos de células) (Figura 20). En los ratones heterocigotos, solamente el contenido de macrófagos se vio reducido (p=0.02). En cuanto al contenido de CMLV, los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mostraron un incremento del 79% comparados con los ratones control (p<0.03). Como consecuencia,

el cociente CMLV/macrófagos se vio incrementado en las lesiones de los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> indicando un cambio hacia un fenotipo mucho más estable en las lesiones ateroscleróticas avanzadas.

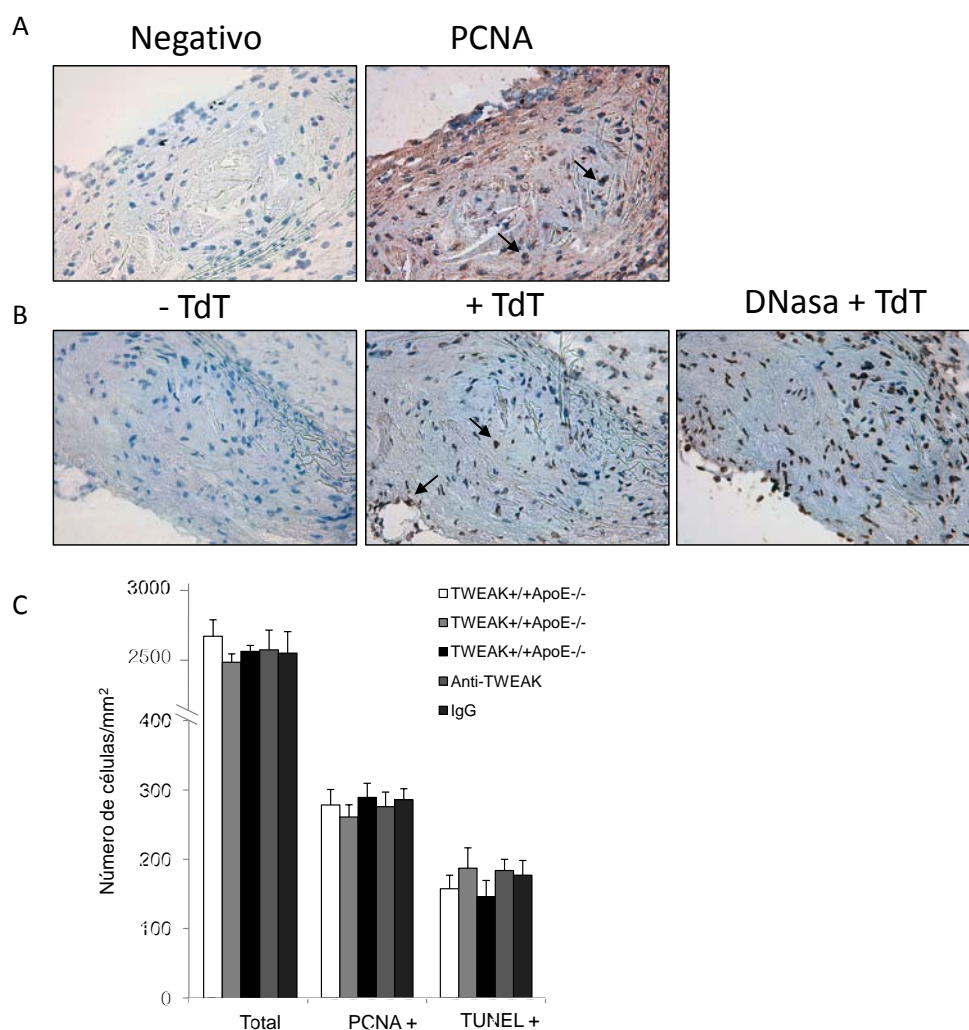


**Figura 20. La deletión de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK reduce el contenido macrofagocitario en las placas ateroscleróticas avanzadas en los ratones deficientes para ApoE.**

A) Fotografías representativas y B) su correspondiente cuantificación de secciones de seno aórtico de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas donde se muestran diferentes tinciones para alfa-actina, Mac-3 y adipofilina. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.05$  vs control IgG. Escala, 50  $\mu$ m.

C) La estabilidad de la placa se evaluó a partir del cociente alfa-actina/Mac-3. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo \*  $p < 0.005$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.001$  vs control IgG.

Es importante aclarar que la disminución del número de macrófagos y células espumosas, unido al incremento del número de CMLV observado en los ratones doble deficientes no está relacionado con cambios en la celularidad de la placa; es decir, el número total de células no varía en los diferentes grupos incluidos en el estudio. Para demostrarlo analizamos en las muestras el grado de proliferación y apoptosis (Figura 21), y ni la cantidad del antígeno de proliferación (PCNA), ni el ensayo TUNEL mostraron cambios entre los diferentes grupos analizados.



**Figura 21. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK no afecta a la proliferación o a la apoptosis en placas ateroscleróticas avanzadas.**

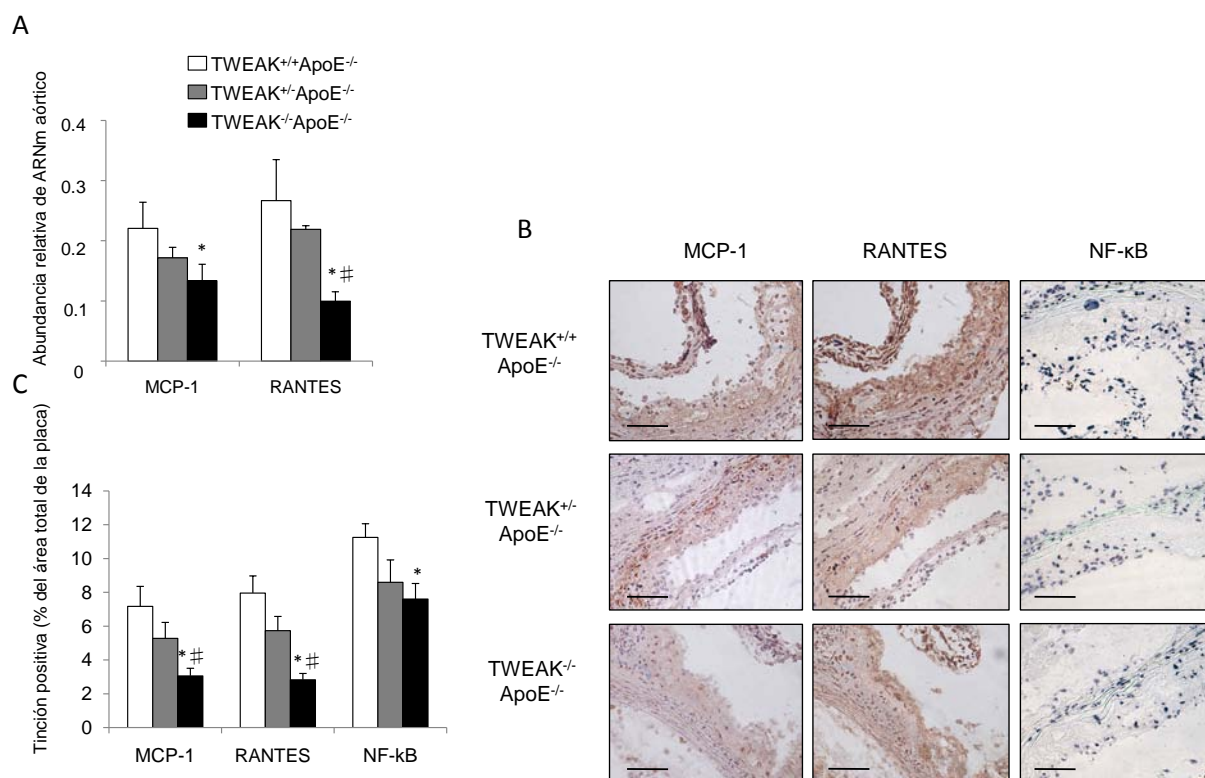
A-B) Tinción representativa para PCNA y TUNEL en lesiones aórticas de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.

C) Cuantificación de PCNA y TUNEL en lesiones del seno aórtico de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas expresada en número de células positivas/ $\mu\text{m}^2$  de lesión. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. El control negativo de PCNA se corresponde con tejido incubado con una IgG inespecífica. El control negativo de TUNEL es tejido incubado sin la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (-TdT). El control positivo de TUNEL es tejido tratado con DNasa I antes de añadir la enzima TdT. (DNasa I + TdT)

Con el fin de esclarecer mejor los mecanismos mediante los cuales la delección de TWEAK conduce a un menor contenido de macrófagos, evaluamos la expresión de diversas quimioquinas inflamatorias que han demostrado desempeñar un papel importante en la respuesta proinflamatoria asociada a la progresión de la placa aterosclerótica (Weber and Noels 2011; Zernecke and Weber 2010). Dentro del grupo de las quimioquinas, MCP-1 y RANTES merecen una mención especial por su participación en el reclutamiento de monocitos/macrófagos en las placas ateroscleróticas (Zernecke

& Weber 2010) y cuya expresión está controlada por el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB) (de Winther et al. 2005).

Las lesiones tempranas de los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> presentaron una menor expresión de ambas quimioquinas, tanto a nivel proteico como de ARNm, así como una menor actividad del factor NF-κB si los comparamos con sus respectivos controles (p=0.005; p<0.001 y p=0.008; respectivamente) (Figura 22).



**Figura 22. La delección de TWEAK disminuye la expresión de quimioquinas proinflamatorias y la activación de NF-κB en placas ateroscleróticas tempranas de ratones deficientes para ApoE.**

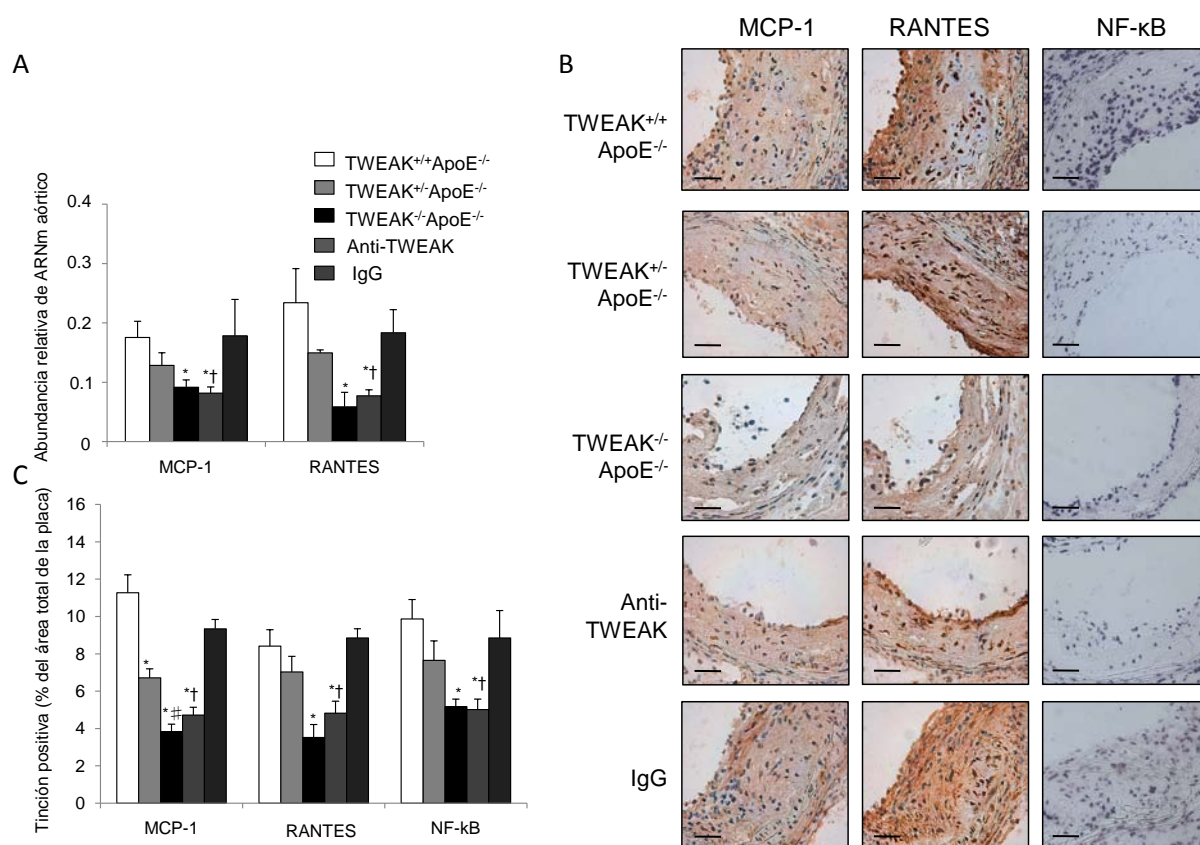
A) Análisis de la PCR a tiempo real correspondiente a la expresión del RNA mensajero de RANTES y MCP-1 en la aorta total de ratones de 24 semanas TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> y TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados se expresan como la media ± EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \* p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; # p<0.05 vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

B) Tinción representativa de RANTES, MCP-1 y NF-κB en el seno aórtico de ratones deficientes de 24 semanas. Escala: 50 μm

C) Cuantificación de la tinción positiva para MCP-1, RANTES y NF-κB del seno aórtico de ratones deficientes de 24 semanas TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9), TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=7) y TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9). Los valores mostrados se expresan como la media ± EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \* p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; # p<0.05 vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

El efecto anti-inflamatorio del déficit de TWEAK fue mucho más notorio en las placas avanzadas ya que tanto la expresión proteica y génica de MCP-1 y RANTES, como la actividad de NF-κB se vieron fuertemente disminuidas en los ratones doble deficiente respecto a sus controles (p<0.001 para todos) (Figura 23).





**Figura 23. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK redujo la expresión de quimioquinas proinflamatorias y la activación de NF-κB en placas ateroscleróticas avanzadas de ratones deficientes para ApoE.**

A) Análisis de la PCR a tiempo real correspondiente a la expresión del RNA mensajero de RANTES y MCP-1 en la aorta total de ratones de 40 semanas. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.005$  vs control IgG.

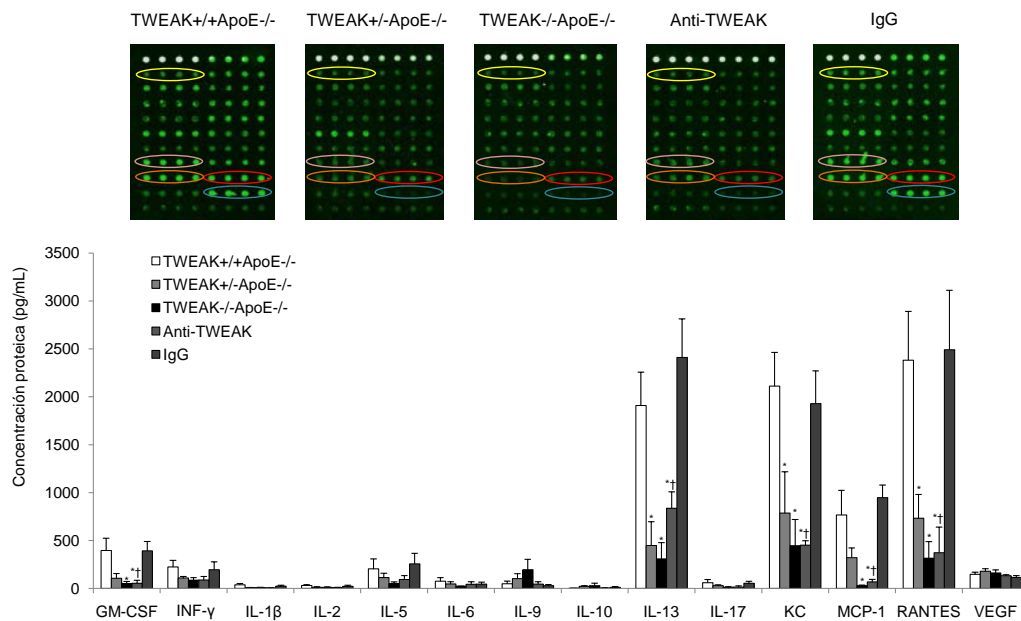
B) Micrografías representativas de la tinción de RANTES, MCP-1 y NF-κB en el seno aórtico de los diferentes genotipos de ratones de 40 semanas. Escala: 50  $\mu$ m

C) Cuantificación de la tinción positiva para MCP-1, RANTES y NF-κB del seno aórtico de ratones deficientes de 40 semanas. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.005$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.005$  vs control IgG.

Con el fin de confirmar los cambios observados en el perfil inflamatorio, analizamos las concentraciones séricas de 20 citoquinas mediante un array proteico: IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-gamma, KC, MCP-1, M-CSF, RANTES, TNF alfa y VEGF-A en los diferentes grupos de ratones de 40 semanas de edad incluidos en el estudio (Figura 24). Del total de citoquinas, catorce fueron detectadas en el suero de los distintos animales analizados, y de esas catorce, cinco presentaron diferencias significativas entre el grupo doble deficiente y el grupo control. Estas cinco citoquinas fueron: MCP-1, RANTES, KC (proteína quimioattractante de queratinocitos), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) e IL-13 (interleuquina 13). En todas ellas, los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> presentaron

#### IV Resultados

niveles mucho menores que los TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>. No se observaron cambios en las nueve citoquinas restantes.



**Figura 24. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK reduce las concentraciones plasmáticas de citoquinas en ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

A) Array representativo de citoquinas procedentes de sueros de ratones de 40 semanas. Las matrices fueron escaneadas usando el escáner de microarrays GenePix 4000, mientras que el análisis de las imágenes se hizo con el software GenePix Pro (versión 6.0)

B) Cuantificación de las citoquinas en suero de ratones de 40 semanas. Los valores mostrados se expresan como la media ± EEM. (N=8 por grupo) \*p < 0.05 vs controles

### IV.1.3 El tratamiento terapéutico con un anticuerpo monoclonal anti-TWEAK reduce el tamaño de la lesión e incrementa la estabilidad de la placa en el seno aórtico

Una vez demostrado que la delección génica de TWEAK disminuye el desarrollo de la lesión aterosclerótica, quisimos analizar si el tratamiento terapéutico con anti-TWEAK reduciría la progresión de la placa aterosclerótica. Además del tamaño, también analizamos si el tratamiento provocaba cambios en la composición de la placa que podrían contribuir a una mayor estabilidad de la misma.

En estos experimentos, 20 ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> de 24 semanas de edad fueron tratados durante 16 semanas (edad del sacrificio 40 semanas) bien con un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK, o con un anticuerpo IgG inespecífico a razón de 10 µg /kg dos veces a la semana en ambos grupos. A continuación comparamos los dos grupos tratados (IgG y anti-TWEAK) con el grupo TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> de 40 semanas sin tratar. El resultado de esa comparativa fue que los ratones inyectados con anti-TWEAK mostraron una disminución tanto en la carga aterosclerótica como en el tamaño de la placa comparado con cualquiera de los grupos control de 40 semanas, ya sea el grupo tratado con IgG (p=0.007, p=0.04 respectivamente), como con el grupo TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (p=0.002, p=0.003 respectivamente) (Figuras 16 y 17). Tal y como se esperaba, no se encontraron diferencias en el tamaño de la placa entre los animales TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> sin tratar y los TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> tratados con IgG. Además de una disminución en la carga aterosclerótica y el tamaño de las placas, los ratones tratados con anti-TWEAK presentaron una reducción del contenido lipídico del seno aórtico comparado con el grupo control (p=0.02 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> y p<0.001 vs grupo IgG; Figura 17). Por otra parte, si bien la terapia con anti-TWEAK aumentó el colágeno en los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, si los comparamos con los ratones control tratados con IgG, no existen diferencias significativas entre ambos grupos. El cociente colágeno/lípidos en cambio, sí se vio incrementado en los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> tratados con anti-TWEAK (p=0.03) (Figura 18) indicando que el tratamiento terapéutico con anti-TWEAK aumenta la estabilidad de la placa.

Además del cociente colágeno/lípidos, el tratamiento con anti-TWEAK incrementó el número total de células del músculo liso vascular (p=0.02) y redujo tanto los macrófagos como las células espumosas (p=0.02 para Mac-3 y p=0.01 para adipofilina) en las lesiones de los senos aórticos (Figura 20). Como resultado, la relación CMLV/macrófagos aumentó (p<0.001) en los ratones tratados con anti-TWEAK (Figura 20C).

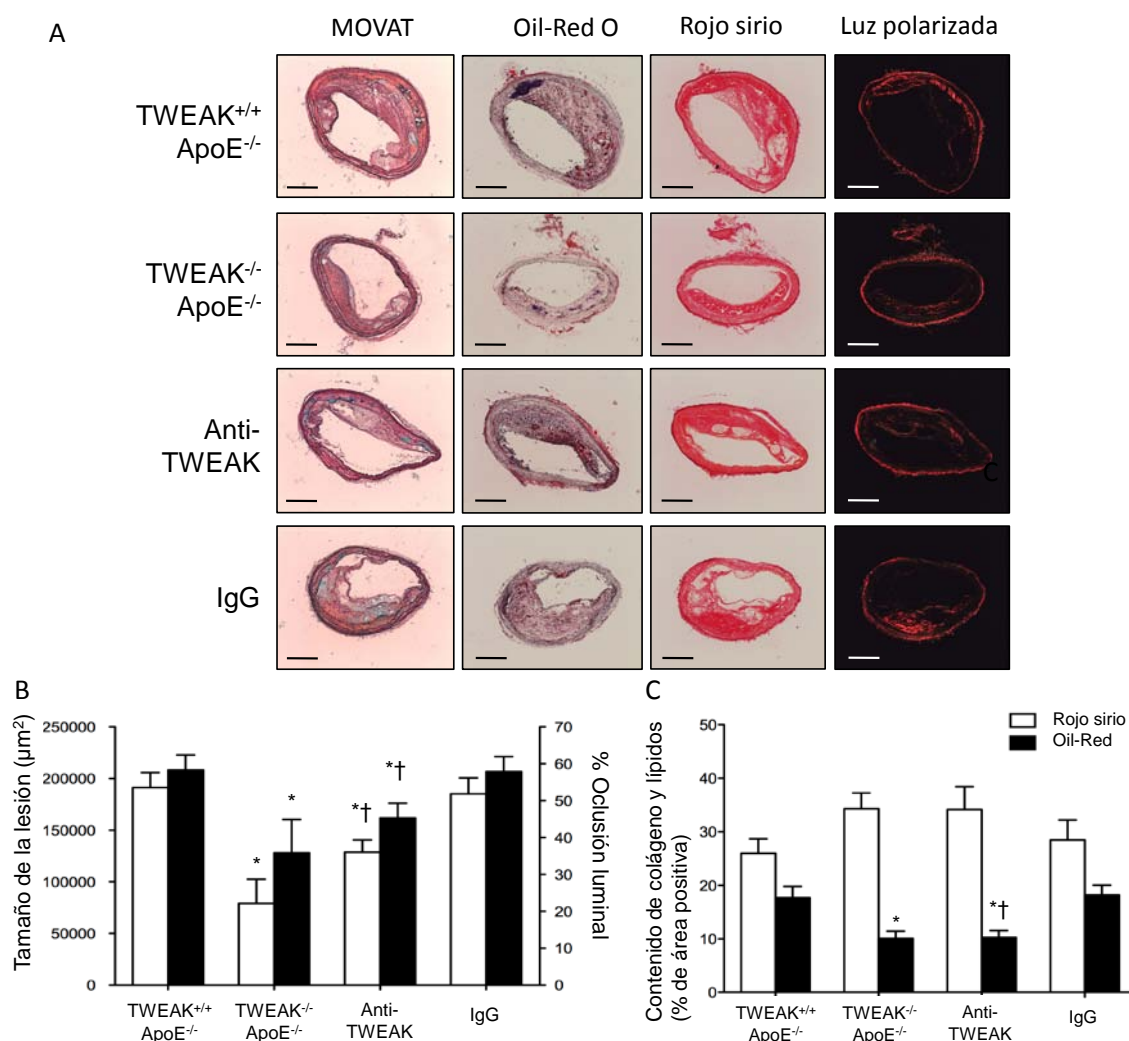
Asimismo, la expresión de MCP-1 y RANTES ( $p < 0.001$  en ambos casos) por un lado, y la activación de NF- $\kappa$ B ( $p = 0.01$ ) por otro, se vieron también disminuidas en los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> tratados con anti-TWEAK, si los comparamos con los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> sin tratar y los tratados con IgG (Figura 23). Si tenemos en consideración todos los resultados mencionados, deducimos que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal bloqueante de TWEAK reduce considerablemente la respuesta inflamatoria e incrementa los parámetros indicadores de estabilidad de la placa en los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

#### **IV.1.4 La delección de TWEAK o el tratamiento terapéutico con anti-TWEAK reduce el tamaño de la lesión y mejora las características relacionadas con la inestabilidad de placa en la arteria braquiocefálica.**

Una vez demostrado el efecto proaterogénico de TWEAK en el seno aórtico, quisimos analizar el papel de esta proteína en otros territorios vasculares. Para ello escogimos la arteria braquiocefálica donde las placas ateroscleróticas avanzadas presentan rasgos fenotípicos similares a los observados en las lesiones humanas inestables (Rosenfeld, Polinsky, Virmani, Kauser, Rubanyi, & Schwartz 2000; Williams et al. 2002) y algunas de estas características son más evidentes que en las lesiones encontradas en los senos aórticos.

Debido a que las lesiones ateroscleróticas procedentes de las arterias braquiocefálicas de los ratones de 24 semanas de edad representan un estadio demasiado temprano en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (principalmente estrías grasas) (Rosenfeld et al. 2008), se estudiaron únicamente las procedentes de ratones de 40 semanas de edad. Al estudiar las lesiones de estos ratones observamos que el tamaño de las placas ateroscleróticas en la arteria braquiocefálica era considerablemente menor en los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> que en los controles TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (Figura 25). Del mismo modo, los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> exhibieron un porcentaje reducido de oclusión luminal si los comparamos con los controles. Resulta interesante recalcar que los ratones tratados con anti-TWEAK también mostraron una disminución en el tamaño de la placa y un menor porcentaje de oclusión luminal comparado con los grupos control (TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> sin tratar o TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> tratados con IgG) (Figura 25).





**Figura 25. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica y el porcentaje de oclusión luminal en la arteria braquiocefálica de los ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

A) Fotografías representativas de secciones de arteria braquiocefálica procedentes de los diferentes grupos teñidas siguiendo el protocolo pentacrómico de Movat, rojo sirio y oil-red-O. Escala: 200 μm.

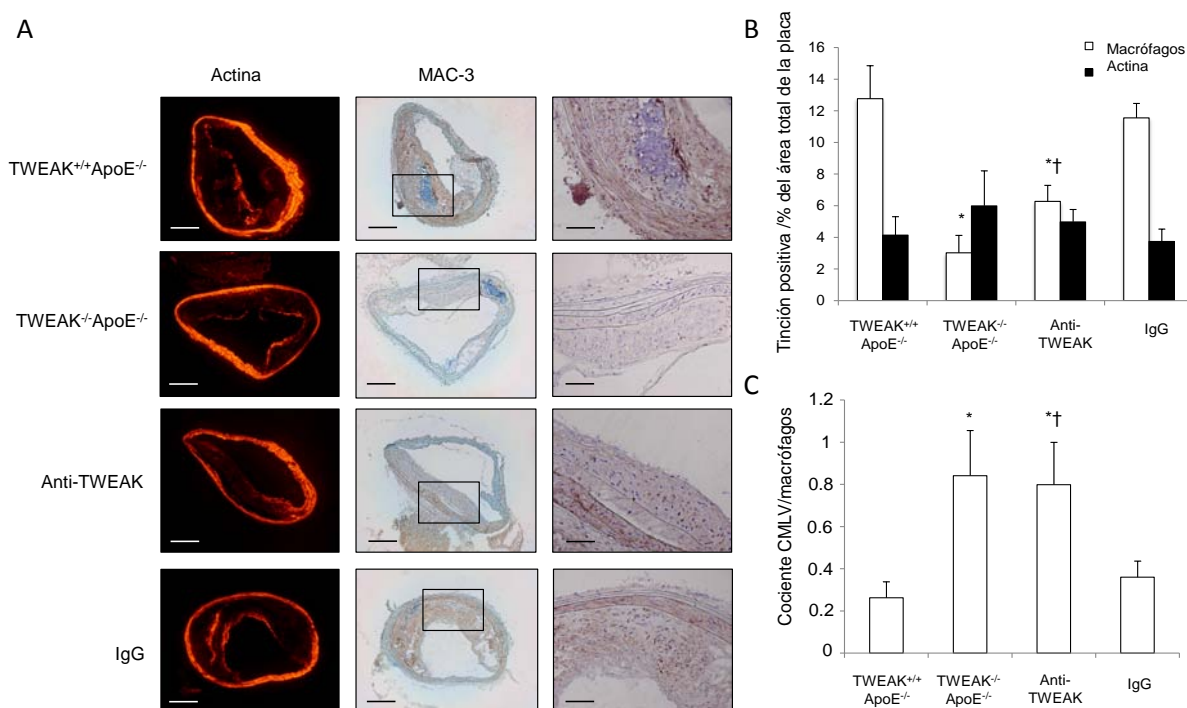
B) Media del área de la máxima lesión por grupo y porcentaje de oclusión luminal en la arteria braquiocefálica. Los valores mostrados se muestran como la media ± EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.01$  vs control IgG.

C) Cuantificación de las tinciones correspondientes a rojo sirio y oil-red. La media de las áreas correspondientes a la deposición lipídica y al contenido de colágeno de todos los ratones de cada grupo se muestran con el error estándar de la media \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.05$  vs control IgG.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición de la placa aterosclerótica es crucial para poder valorar adecuadamente su nivel de estabilidad y por tanto, sus probabilidades de una futura rotura. En este sentido, los ratones TWEAK<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> y los TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> tratados con anti-TWEAK mostraron una importante reducción del contenido lipídico comparados con sus respectivos controles (Figura 25 A-C). Del mismo modo, tanto la deficiencia de TWEAK como el tratamiento con

anti-TWEAK incrementaron el contenido de colágeno en la arteria braquiocefálica, si bien, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 25 A-B). Por consiguiente, el cociente colágeno/lípidos de tanto los TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> como de los tratados con el anticuerpo fue superior al doble del obtenido en los grupos control, lo cual refuerza la idea de que la modulación de TWEAK tiene efectos estabilizadores de placa.

Respecto al número total de células del músculo liso vascular, si bien existe un incremento tanto en el grupo de ratones doble deficientes como en el grupo tratado con anti-TWEAK, no se observaron diferencias estadísticas significativas (Figura 26A-B). Sin embargo, el contenido macrofagocitario disminuyó tanto en los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> como en los TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> tratados con anti-TWEAK si los comparamos con los ratones control ( $p < 0.05$ ) (Figura 26A-B). Como consecuencia, el cociente CMLV/macrófagos se vio incrementado en los dos grupos de estudio (Figura 26C). Estos resultados demuestran un cambio en el contenido celular de los ratones doble deficientes o tratados con anti-TWEAK lo que conduce a un fenotipo más estable de sus placas.



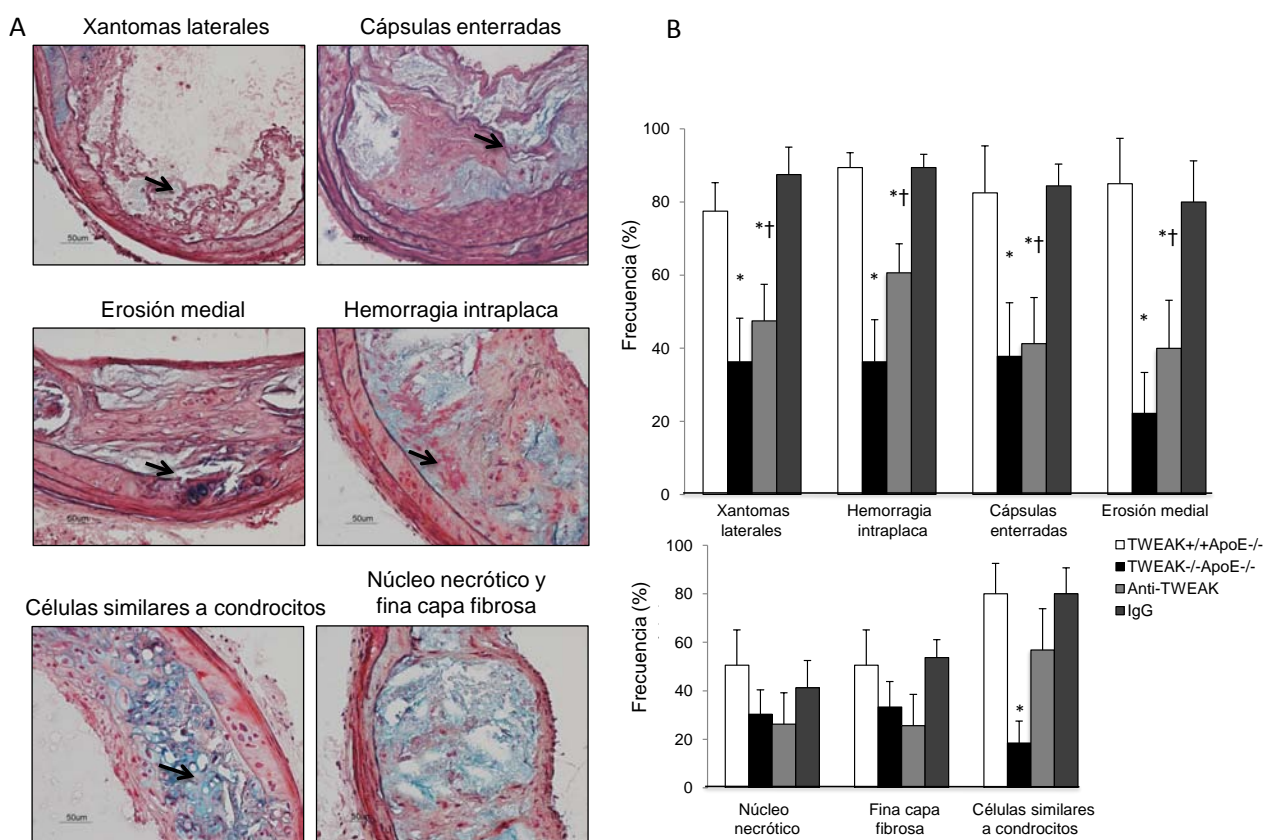
**Figura 26. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK disminuye el número de macrófagos e incrementa el contenido de CMLV en la arteria braquiocefálica de los ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

A-B) Inmunohistoquímica y cuantificación de alfa-actina y Mac-3 en las lesiones braquiocefálicas de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM en todos los animales incluidos en cada grupo \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p = 0.001$  vs control IgG. Barra de escala blanca: 200  $\mu$ m; barra de escala negra: 50  $\mu$ m.

C) La estabilidad de la placa se evaluó a partir del cociente alfa-actina/Mac3. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.05$  vs control IgG.

Para determinar si la deficiencia de TWEAK altera la estabilidad de las placas ateroscleróticas, analizamos otras propiedades que están asociadas o contribuyen a la inestabilidad de placa, tales como la presencia de xantomas laterales, cápsulas enterradas, núcleos necróticos, presencia de una fina capa fibrótica, erosión de la media, hemorragia intraplaca y contenido de calcio (Rosenfeld, Polinsky, Virmani, Kauser, Rubanyi, & Schwartz 2000).

Al examinar todas estas propiedades, tanto los ratones  $\text{TWEAK}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$  como los  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$  tratados con anti-TWEAK mostraron una frecuencia reducida de xantomas laterales, erosión de la media y presencia de cápsulas enterradas, comparados con sus respectivos grupos control (Figura 27 A-B). Respecto a la presencia de núcleos necróticos y fina capa fibrótica, tanto los doble deficientes como los tratados mostraron una tendencia a la baja si los comparamos con los  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$  o los tratados con IgG control aunque sin llegar a alcanzar relevancia estadística.



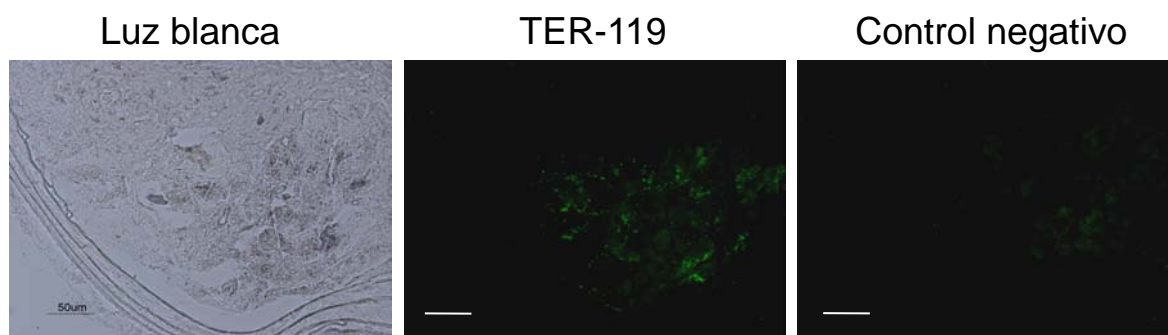
**Figura 27. La delección de TWEAK o el tratamiento anti-TWEAK aumentó la estabilidad de las placas presentes en la arteria braquiocefálica de los ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

A) Fotografías representativas de secciones de arteria braquiocefálica teñidas según el protocolo pentacrómico de Movat en donde se puede observar la presencia de xantomas laterales, cápsulas enterradas, erosión medial, hemorragia intraplaca, células similares a condrocitos, núcleo necrótico y fina capa fibrótica. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

B) Frecuencia de los marcadores morfológicos de inestabilidad de placa en la arteria innominada de los ratones deficientes para ApoE. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p < 0.05$  vs  $\text{TWEAK}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$ ; †  $p < 0.05$  vs control IgG.

Se ha sugerido que la hemorragia intraplaca, definida como la presencia de hematíes dentro de la placa, se presenta predominantemente en el interior de los xantomas laterales y se corresponde con el mismo tipo de rotura que se da a lo largo de los márgenes laterales en las placas humanas (Rosenfeld, Polinsky, Virmani, Kauser, Rubanyi, & Schwartz 2000). La existencia de este tipo de hemorragia en el interior de la placa se encuentra disminuida tanto en el grupo doble deficientes como en los ratones tratados con anti-TWEAK si los comparamos con el grupo control (Figura 27 A-B). La presencia de hemorragia intraplaca se confirmó a través de una inmunohistoquímica específica para TER-119, un marcador de glóbulos rojos (Figura 28).

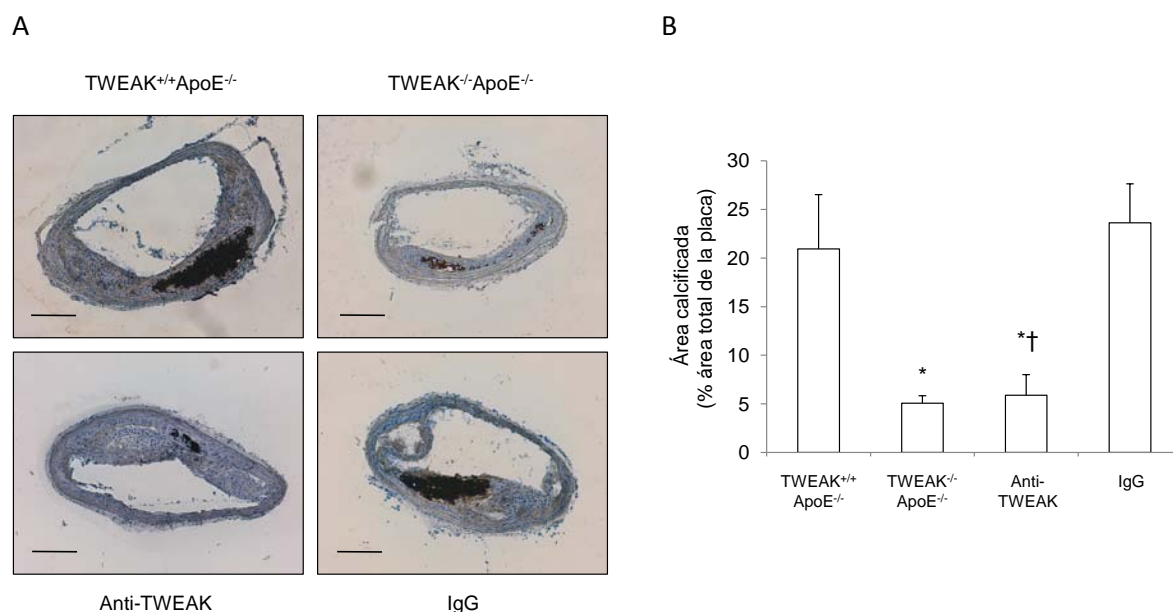
Los sitios donde tuvieron lugar la mayor parte de las hemorragias fueron en el interior de las zonas necróticas, en los xantomas laterales y bajo la fina capa fibrótica en los márgenes laterales de las lesiones.



**Figura 28. Presencia de eritrocitos en las lesiones ateroscleróticas procedentes de la arteria braquiocefálica de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.**

Fotografías mostrando inmunofluorescencia específica para TER-119. Escala: 50 µm

Finalmente, está descrito que las CMLV pueden convertirse en células osteogénicas (similares a condrocitos) *in vitro*, lo cual sugiere que pueden jugar un papel en la calcificación vascular *in vivo* (Steitz et al. 2001). De hecho, grandes cantidades de calcio se asocian con una mayor vulnerabilidad en pacientes (Alexopoulos and Raggi 2009). En este sentido, la presencia de células similares a condrocitos se vio disminuida en los ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> comparados con los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (Figura 27). Este tipo de células también se redujo en los ratones tratados con anti-TWEAK, si bien esta tendencia no alcanzó significancia estadística. No obstante, cuando analizamos el contenido en calcio del interior de la placa aterosclerótica mediante la tinción Von Kossa, tanto los dobles deficientes como los tratados con el anticuerpo exhibieron una reducción significativa del calcio comparados con sus respectivos controles (figura 29).



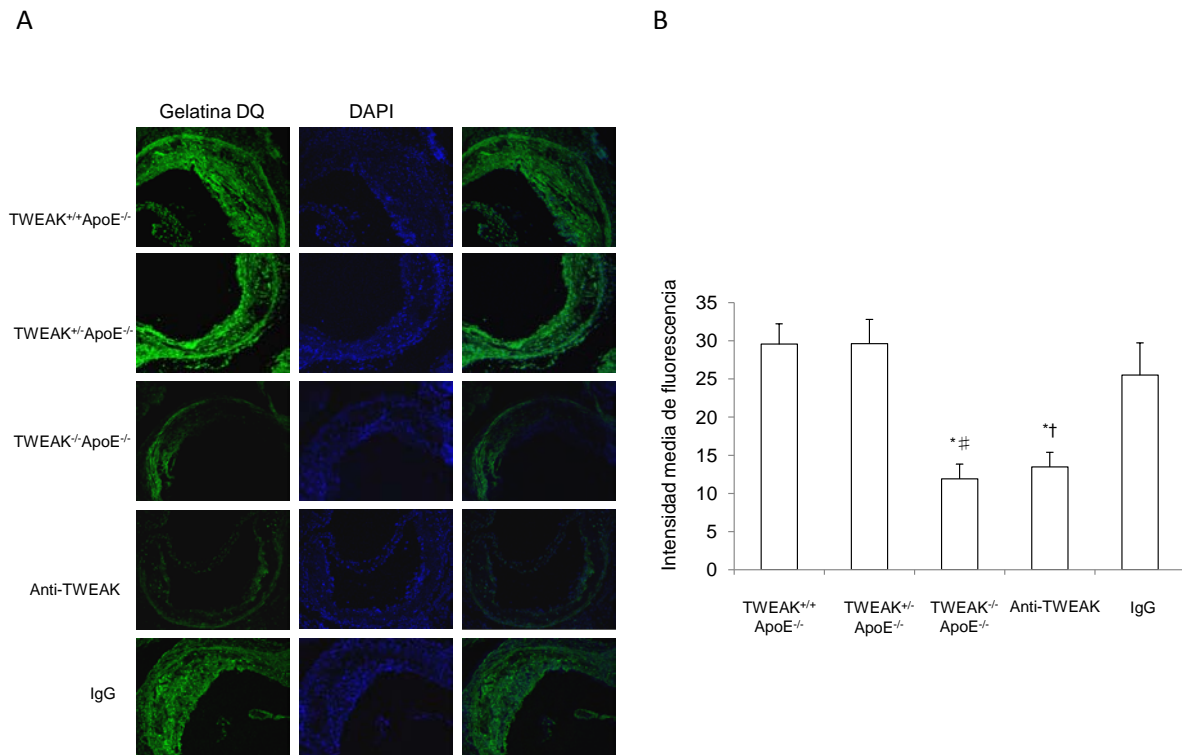
**Figura 29. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK redujo la calcificación en las lesiones de la arteria braquiocefálica de los ratones deficientes para ApoE.**

A) Micrografía representativa y B) cuantificación de la tinción de Von Kossa en la arteria innominada de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas. Escala: 200  $\mu$ m. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. \*  $p < 0.01$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.001$  vs control IgG.

Considerando todos estos resultados, podemos afirmar que tanto la deficiencia de TWEAK como el tratamiento con anti-TWEAK reducen varios de los principales rasgos asociados a un fenotipo de placa inestable, favoreciendo su estabilidad.

#### IV.1.5 La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK disminuye la actividad gelatinolítica en las lesiones ateroscleróticas avanzadas.

Además de la composición de la placa, la actividad de las metaloproteinasas (MMP) ejerce un gran impacto en la estabilidad de la placa (Newby 2008). A raíz de esta hipótesis chequeamos el grado de activación de las MMP de las lesiones ateroscleróticas avanzadas presentes tanto en el seno aórtico como en las arterias braquiocefálicas. La zimografía in situ con gelatina marcada con fluoresceína realizada en las placas ateroscleróticas presentes tanto en el seno aórtico como en las arterias braquiocefálicas mostraron una disminución de la intensidad de fluorescencia en los ratones doble deficientes respecto a los controles (figuras 30 y 31). Del mismo modo, la terapia anti-TWEAK redujo la intensidad de la fluorescencia media si lo comparamos con los TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> o los tratados con IgG. El conjunto de todos estos datos evidencia que TWEAK ejerce un papel en el remodelado vascular asociado a la inestabilidad de la placa aterosclerótica.

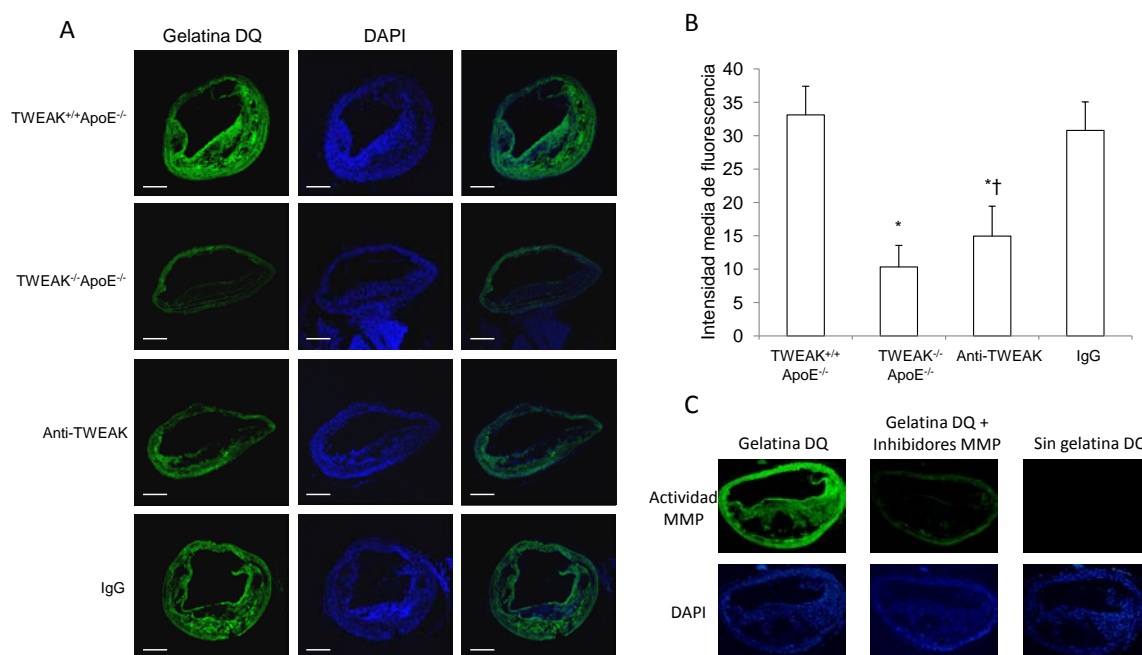


**Figura 30. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK redujo la actividad gelatinolítica en las placas ateroscleróticas avanzadas presentes en el seno aórtico de los ratones deficientes para ApoE.**

A) Fotografías representativas de microscopia de fluorescencia mostrando el ensayo para medir la actividad de la gelatinasa in situ mediante gelatina-DQ® en secciones de seno aórtico de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.

B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia en las lesiones ateroscleróticas presentes en el seno aórtico. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en el grupo. \*  $p < 0.001$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.001$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p = 0.01$  vs control IgG.





**Figura 31. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK redujo la actividad gelatinolítica en la arteria braquiocefálica de los ratones deficientes para ApoE.**

A) Fotografías representativas de microscopia de fluorescencia mostrando el test para medir la actividad de la gelatinasa in situ mediante gelatina-DQ® en secciones de arteria braquiocefálica de ratones deficientes para ApoE de 40 semanas.

B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia en las lesiones ateroscleróticas presentes en el seno aórtico. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM de todos los animales incluidos en el grupo \*  $p < 0.01$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p = 0.02$  vs control IgG. Escala: 200  $\mu$ m.

C) Fotografías de fluorescencia representativas del ensayo de gelatinasa in situ con la gelatina DQ realizado en la arteria braquiocefálica en presencia o ausencia de inhibidores de MMP: ilomastato (10  $\mu$ mol/ml) y fenantrolina (0.5 mmol/ml). Escala 200  $\mu$ m.

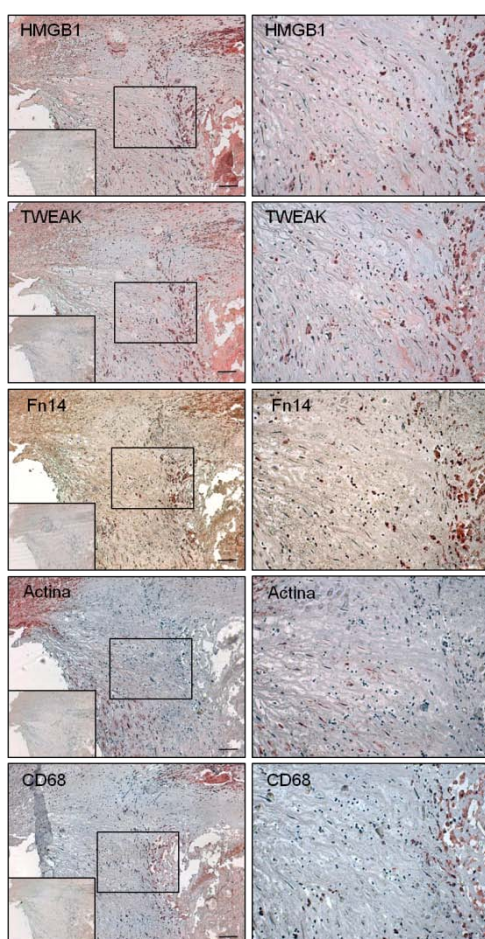
## **Parte II: TWEAK AUMENTA LA EXPRESIÓN Y LA SECRECIÓN DE HMGB1 EN PLACAS ATROSCLERÓTICAS HUMANAS Y MONOCITOS EN CULTIVO.**

### **IV.II.1 Presencia y asociación entre la expresión de HMGB1, TWEAK y Fn14 en placas ateroscleróticas de carótidas humanas.**

En un principio, HMGB1 estaba considerada como una de las proteínas más importantes dentro de la cromatina cuyo principal papel era interactuar con los nucleosomas, los factores de transcripción e histonas facilitando así la organización del DNA y regulando la transcripción. Sin embargo, hace 15 años se descubrió que también era liberado por células inflamatorias en la fase más tardía de la respuesta inflamatoria. De ese descubrimiento se extrae que además de como estabilizador de cromatina, HMGB1 también podía funcionar como mediador de la inflamación inducida por citoquinas proinflamatorias, contribuyendo así a la progresión de la lesión y la cronificación de la inflamación (Kalinina, Agrotis, Antropova, DiVitto, Kanellakis, Kostolias, Ilyinskaya, Tararak, & Bobik 2004). Dado que hemos demostrado que TWEAK y Fn14 también juegan un papel crucial en la patología de la aterosclerosis, decidimos estudiar la posible correlación entre HMGB1, TWEAK y Fn14 en placas ateroscleróticas. Para ello realizamos diferentes inmunohistoquímicas para TWEAK, Fn14 y HMGB1 en secciones seriadas de 25 placas ateroscleróticas procedentes de arterias carótidas humanas, así como su colocalización con CMLV y macrófagos. Los resultados obtenidos indicaron que tanto TWEAK como Fn14 estaban fuertemente expresados en las áreas positivas tanto para CMLV ( $\alpha$ -actina) como para macrófagos (CD68), mientras que HMGB1 se expresó principalmente en las áreas ricas en macrófagos dentro de las placas ateroscleróticas (Figura 32A). Además, los análisis de la expresión de HMGB1, TWEAK y Fn14 revelaron una sólida correlación lineal positiva tanto entre HMGB1 y Fn14 ( $r=0.616$ ;  $P<0.001$ ), como entre HMGB1 y TWEAK ( $r=0.526$ ;  $P=0.034$ ). Estas asociaciones positivas adquirieron aún más relevancia si sólo considerábamos la región de los hombros de la lesión (la cual se caracteriza por su alto contenido en macrófagos infiltrantes) (Figura 32B). No obstante no ocurrió lo mismo cuando analizamos la relación entre estas variables en la región de la cápsula (capa celular que rodea al núcleo necrótico), donde la asociación no llegó a ser estadísticamente significativa ni para TWEAK ( $r=0.089$ ; no significativo) ni para Fn14 ( $r=-0.008$ ; no significativo). Si tenemos en cuenta todos estos datos, nuestros resultados indicarían que el sistema TWEAK-Fn14 podría participar en la regulación de la expresión de HMGB1 en monocitos/macrófagos dentro de la lesión vascular.



A

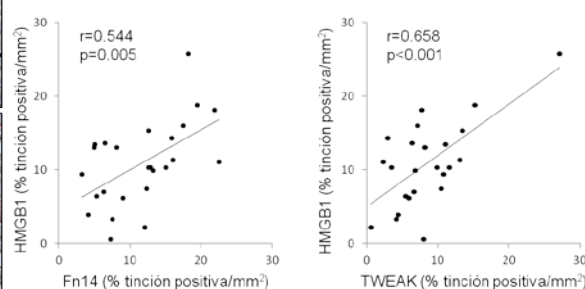


**Figura 32. Inmunohistoquímica de HMGB1, TWEAK y Fn14 en placas ateroscleróticas procedentes de carótidas humanas.**

A) Fotografías representativas de la expresión de HMGB1, TWEAK y Fn14 en áreas positivas para macrófagos (CD68+) y CMLVs ( $\alpha$ -actina) en placas ateroscleróticas carotídeas. Los recuadros de la esquina representan secciones de tejido incubadas con una IgG inespecífica (control negativo). El rectángulo indica la región de interés que se muestra magnificada en la columna derecha. Escala 100  $\mu$ m

B) Correlación de Pearson entre HMGB1 y TWEAK o Fn14 en los hombros de la lesión aterosclerótica (n=25).

B

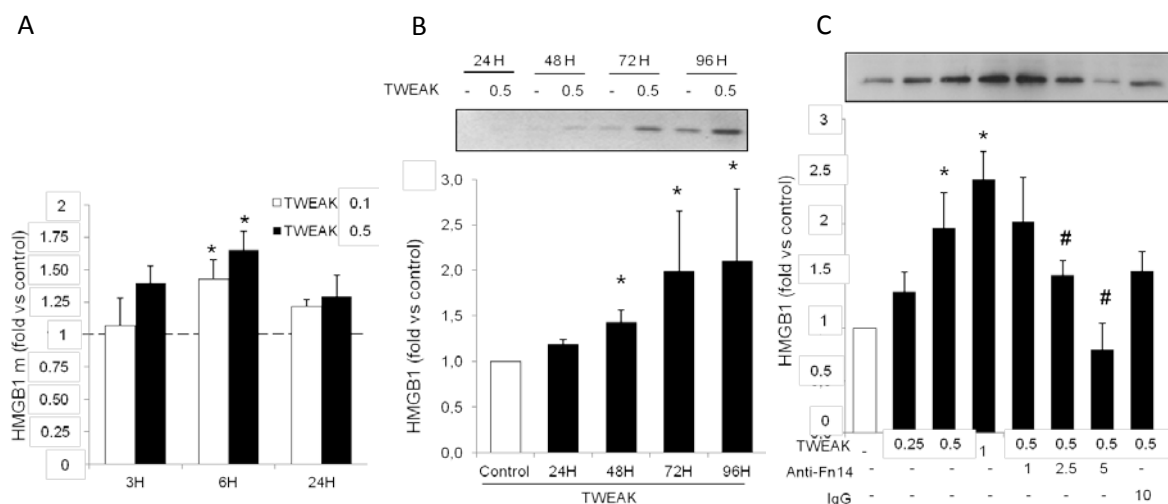


#### IV.II.2 TWEAK aumenta la expresión y la secreción de HMGB1 en monocitos THP-1 cultivados.

Como HMGB1 se asocia con TWEAK en las áreas ricas en macrófagos de las placas ateroscleróticas, decidimos estudiar si TWEAK podía modular la expresión y la secreción proteica de HMGB1 en monocitos humanos *in vitro*. Para llevar a cabo este estudio cultivamos células THP-1 en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de TWEAK humano recombinante (0.1 y 0.5  $\mu$ g/ml) y posteriormente analizamos la expresión del ARN mensajero de HMGB1. La PCR a tiempo real reveló que TWEAK incrementó la expresión del ARNm de HMGB1 de manera dosis-dependiente (Figura 33A) con una máxima expresión a las seis horas.

HMGB1 se expresa predominantemente en el interior del núcleo celular y tras estimular su expresión, es liberado al citoplasma y luego secretado al medio. Por esta razón analizamos la secreción de HMGB1 en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales. TWEAK incrementó el contenido de HMGB1 en el medio de cultivo de manera tiempo y dosis-dependiente (Figura 33 B-C). Estos resultados se confirmaron posteriormente en monocitos

circulantes humanos extraídos de sangre periférica (Figura 34). Para determinar la implicación del receptor de TWEAK en la señalización del mecanismo subyacente a la inducción de HMGB1 por TWEAK, analizamos también el efecto de un anticuerpo bloqueante de Fn14 en la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK. La preincubación con un anticuerpo anti-Fn14 previno la secreción de HMGB1 activada por TWEAK (Figura 33 C). No se observó ningún efecto cuando las células fueran incubadas con un anticuerpo IgG inespecífico (Figura 33C), lo que denota que el efecto de TWEAK observado es mediado por su receptor funcional Fn14.

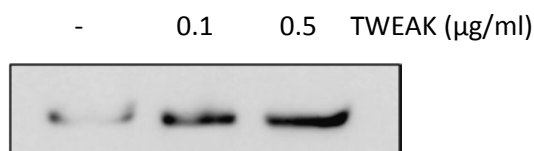


**Figura 33. TWEAK incrementa la expresión del RNA mensajero de HMGB1 en monocitos THP-1 cultivados.**

A) Análisis de la PCR en tiempo real del ARNm de HMGB1 procedente de monocitos THP-1 estimulados con diferentes concentraciones de TWEAK recombinante. Los valores de HMGB1 fueron corregidos con el gen endógeno 18S y los resultados normalizados respecto al control. Resultados expresados como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

B) Imagen representativa y análisis de la secreción de HMGB1 a nivel de proteína (Western Blot) de los monocitos THP-1 incubados con TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL) a diferentes tiempos. Los valores se han normalizado respecto al control en cada tiempo y los resultados se expresan como n veces versus control. Resultados expresados como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

C) Western blot representativo que muestra la secreción de HMGB1 de células THP-1 incubados con TWEAK humano recombinante a distintas dosis (0.25–1  $\mu$ g/mL) solo o combinado, bien con un anticuerpo anti-Fn14 (1–5  $\mu$ g/mL), o con una IgG inespecífica (10  $\mu$ g/mL) durante un periodo de 72 horas. Resultados expresados como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

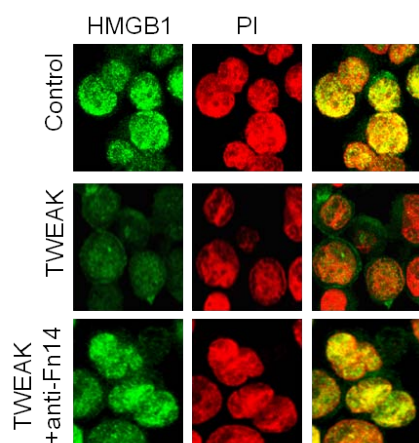


**Figura 34. TWEAK aumenta la secreción de HMGB1 en monocitos humanos circulantes**

Western blot representativo que muestra la secreción de HMGB1 en monocitos humanos en presencia o ausencia de TWEAK humano recombinante (0-0.5  $\mu$ g/mL) durante 72 horas.

### IV.II.3 Regulación por TWEAK de la localización celular de HMGB1

Se ha demostrado que diferentes citoquinas pueden modular la distribución celular de HMGB1 en monocitos humanos (Kalinina, Agrotis, Antropova, DiVitto, Kanellakis, Kostolias, Ilyinskaya, Tararak, & Bobik 2004). Para determinar si la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK también afecta a su distribución celular, monocitos THP-1 cultivados fueron marcados con anticuerpos anti-HMGB1 y posteriormente contrastados con yoduro de propidio. Mientras que las células control expresaron constitutivamente HMGB1 principalmente en el núcleo, la incubación de células THP-1 con TWEAK indujo una redistribución de HMGB1 desde el núcleo al citoplasma (Figura 35). Por el contrario, el pretratamiento de las células con un anticuerpo bloqueante de Fn14, previno la redistribución de HMGB1 mediada por TWEAK en el interior de las células.



**Figura 35. Distribución intracelular de la proteína HMGB1.** En monocitos THP-1 no estimulados, HMGB1 (en la foto en color verde) está básicamente localizado en el núcleo (como se ve en la foto amarilla que se obtiene al superponer la señal verde de HMGB1 y la señal roja del núcleo emitida por el yoduro de propidio). Las células THP-1 expuestas a TWEAK durante dos días contienen altas cantidades de HMGB1 en su citoplasma mientras que apenas se ve el interior del núcleo. Si, por el contrario estimulamos las células con TWEAK junto con un anticuerpo anti-Fn14, esta redistribución citoplasmática no se da y HMGB1 muestra su distribución nuclear típica.

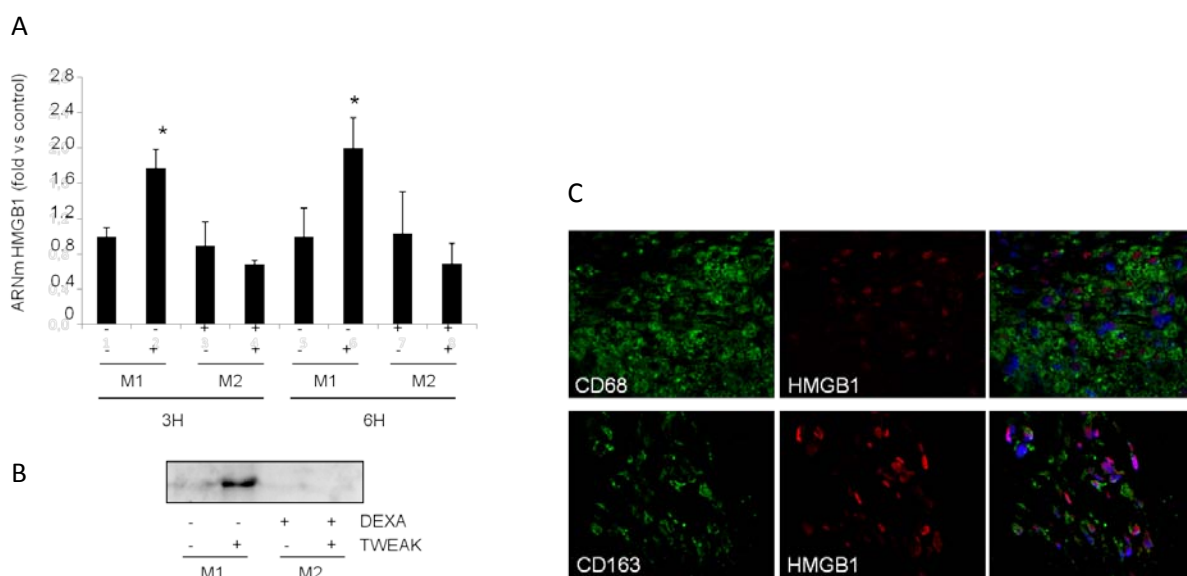
Este resultado nos indica que TWEAK induce un cambio de compartimento celular de HMGB1 desde el núcleo, que es su ubicación normal, al citoplasma; y que esta nueva distribución es necesaria para que HMGB1 ejerza sus efectos proinflamatorios mediados por TWEAK.

### IV.II.4 Los efectos sobre la expresión de HMGB1 mediados por TWEAK están restringidos a los macrófagos proinflamatorios (M1) tanto in vitro como en las placas ateroscleróticas carotídeas.

La diferenciación de los monocitos hacia macrófagos proinflamatorios (M1) o antiinflamatorios (M2) inhibe la secreción de HMGB1 (Lolmede et al. 2009). Con el fin de determinar si los efectos de TWEAK sobre la expresión de HMGB1 dependen del subtipo macrofagocitario, llevamos a cabo estudios in vitro donde células THP-1 que fueron diferenciadas a M1 o a M2 incubándolas 48 horas en presencia de  $10^{-7}$  M de PMA (forbol miristato acetato) en el caso de los macrófagos M1; y alargando la incubación 24 horas más con PMA y dexametasona  $2.5 \times 10^{-7}$  M para

conseguir los macrófagos tipo M2 (Moreno et al. 2009b). Los macrófagos M1 o M2 resultantes fueron estimulados con TWEAK recombinante para analizar la expresión del RNA mensajero de HMGB1. La PCR a tiempo real demostró que HMGB1 se expresaba en ambos tipos de macrófagos, no obstante el tratamiento con TWEAK recombinante aumentó la expresión de HMGB1 solamente en los macrófagos M1 (figura 36A). Del mismo modo, TWEAK aumentó la concentración de HMGB1 en el medio de cultivo de los macrófagos M1, pero no en el de los M2 (figura 36B), indicando que el efecto observado tras la estimulación con TWEAK es específico para macrófagos M1.

Posteriormente analizamos en placas ateroscleróticas procedentes de carótidas humanas la expresión de HMGB1 de acuerdo con el subtipo de macrófagos. Hicimos un doble marcaje inmunohistoquímico para HMGB1 y CD68 (un marcador común para M1 y M2) (Figura 36C) que la expresión de HMGB1 solamente tenía lugar en algunos macrófagos CD68+. Una posterior doble inmunohistoquímica para HMGB1 y CD163 (un marcador específico de macrófagos tipo 2) mostró que la expresión de HMGB1 no colocalizaba con la señal de CD163. Todos estos datos indicarían que son los macrófagos M1 los responsables de la secreción de HMGB1 en las placas ateroscleróticas humanas.



**Figura 36. Efecto de TWEAK sobre HMGB1 en distintos subtipos macrofagocitarios.**

Monocitos THP-1 se diferenciaron a M1 usando PMA durante 48 horas y posteriormente se estimularon con dexametasona 24 horas más para inducir el subtipo M2. Finalmente los macrófagos M1 y M2 se estimularon con TWEAK (0.5 µg/mL).

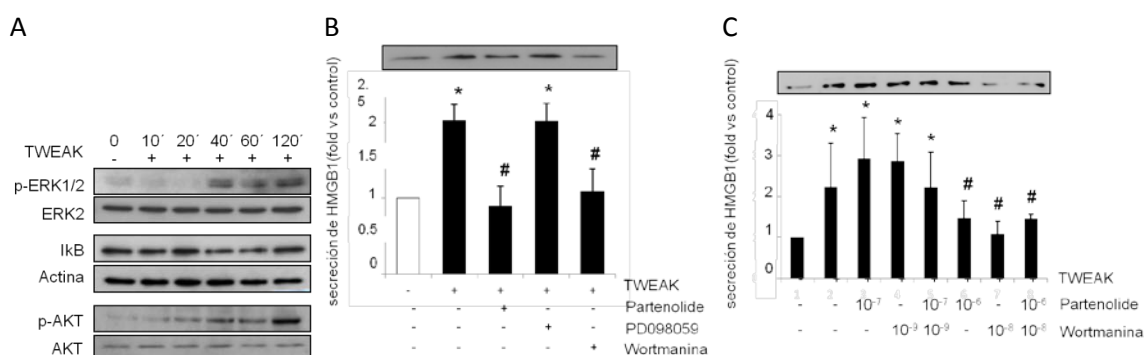
A) Análisis de PCR en tiempo real de la expresión del RNA mensajero de HMGB1 en macrófagos M1 y M2 a 3 y 6 horas.

B) Imagen representativa de western blot mostrando la secreción de HMGB1 en macrófagos M1 y M2 incubados con TWEAK recombinante.

C) Fotografías representativas de dos dobles inmunofluorescencias que muestran la expresión de CD68 (verde, macrófagos totales) y HMGB1 (rojo) por un lado; y CD163 (verde, macrófagos M2) y HMGB1 (rojo) por otro, en los hombros de placas ateroscleróticas humanas. El color azul corresponde al DAPI y señala el núcleo.

#### IV.II.5 Regulación de la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK en monocitos

TWEAK es capaz de regular diferentes vías de señalización tales como ERK1/ERK2, PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B (Roos et al. 2010; Sanz et al. 2009), por lo cual quisimos averiguar si estas rutas de señalización podrían contribuir al aumento de la secreción de HMGB1. Como puede verse en la figura 37A, TWEAK en efecto aumentó la fosforilación de ERK1/ERK2 y AKT de manera tiempo-dependiente. Además, fue capaz de disminuir la proteína inhibidora I $\kappa$ B, lo que deriva en la activación de NF- $\kappa$ B. La preincubación al PD98059 (un inhibidor de la vía ERK1/ERK2) no afectó a la capacidad de TWEAK de elevar la secreción de HMGB1 (Figura 37B). Por el contrario, la wortmanina, un inhibidor de la vía PI3K/AKT; y el partenolide, un inhibidor de NF- $\kappa$ B; atenuaron el aumento de la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK (Figura 37B) de lo cual se deduce que tanto la ruta PI3K/AKT como NF- $\kappa$ B están implicadas en el aumento de la expresión y secreción de HMGB1 inducido por TWEAK. Para averiguar si los efectos mediados por PI3K/AKT eran independientes de los efectuados por NF- $\kappa$ B, tratamos las THP-1 con ambos fármacos, solos o combinados, tanto a dosis altas como a bajas. Tras este experimento no observamos efectos aditivos o sinérgicos en la atenuación o elevación de la secreción de HMGB1 mediada por TWEAK (Figura 37C). Por lo tanto PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B de manera independiente, pero no ERK1/ERK2, regulan el aumento de la secreción de HMGB1 mediada por TWEAK en monocitos cultivados.



**Figura 37. Efecto de los inhibidores de kinasas o del NF- $\kappa$ B en la secreción de HMGB1**

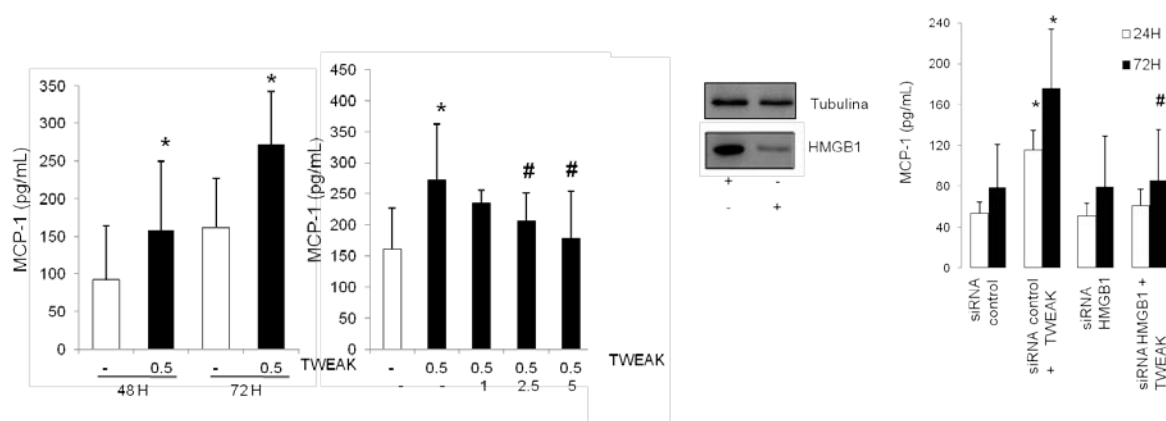
A) El tratamiento con 0.5  $\mu$ g/ml de TWEAK promueve la fosforilación de AKT y ERK 1/2, y la degradación de I $\kappa$ B en monocitos. Los lisados celulares fueron analizados por western blot y se midió la expresión proteica de fosfo-ERK 1/2, fosfo-AKT y el inhibidor de kappa-B (I $\kappa$ B). Cada punto del western se estriepó y se volvió a hibridar con anti-ERK, anti-AKT y  $\beta$ -actina respectivamente.

B) El pretratamiento de monocitos THP-1 con partenolide (10<sup>-6</sup> mol/L) y wortmanina (10<sup>-8</sup> mol/L), pero no con el inhibidor PD98059 (5x10<sup>-7</sup> mol/L), atenúa la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL) a las 72 horas. Media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $P$ <0.05 vs control; # $P$ <0.05 vs TWEAK.

C) El pretratamiento de THP con wortmanina y partenolide solos o combinados, tanto a altas como a bajas dosis, no tiene efectos sinérgicos o aditivos en la atenuación de la elevación de la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL) a las 72 horas. Media  $\pm$  DE de tres experimentos diferentes. \* $P$ <0.05 vs control; # $P$ <0.05 vs TWEAK.

#### IV.II.6 HMGB1 está implicado en la liberación de MCP-1 mediada por TWEAK.

Con el fin de analizar si el incremento de la expresión de HMGB1 inducida por TWEAK contribuye a la respuesta inflamatoria, primero analizamos la secreción de MCP-1 en los sobrenadantes de las células THP-1 cultivadas en presencia o ausencia de TWEAK. Durante este experimento observamos que el MCP-1 soluble aumentó de manera tiempo y dosis dependiente en el medio de cultivo procedente de THP-1 estimuladas con TWEAK (Figura 38A y 38B). En estas condiciones experimentales, un anticuerpo anti-FN14 revirtió la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK (Figura 38B). Posteriormente analizamos la concentración de MCP-1 en los sobrenadantes de THP-1 transfectadas con un ARN pequeño de interferencia para HMGB1. El silenciamiento de HMGB1 resultante previno completamente la liberación a largo plazo de MCP-1 inducida por TWEAK (Figura 38C). No se observaron efectos en las células THP-1 incubadas con el ARN pequeño de interferencia control (Figura 38B)



**Figura 38. TWEAK estimula la secreción de MCP-1 a través de HMGB1 en monocitos THP-1**

A) Secreción de MCP-1 en células THP-1 tratados con 0.5 µg/mL de TWEAK a 48 y 72 horas

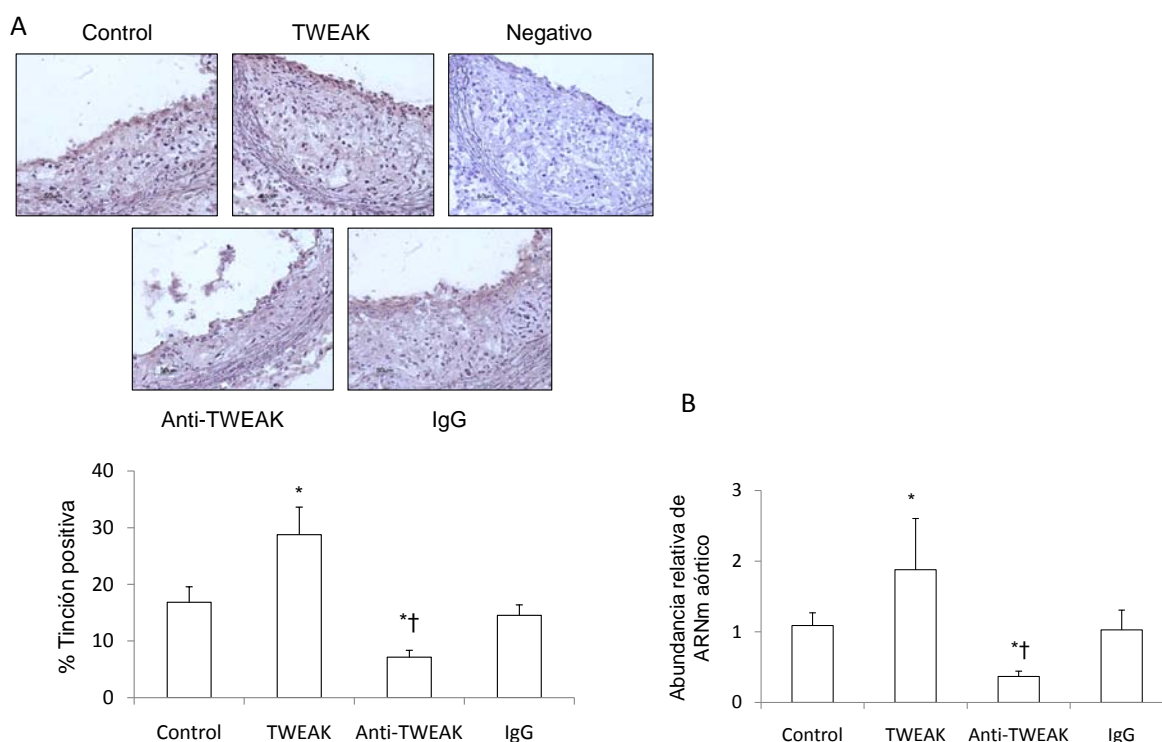
B) Secreción de MCP-1 en células THP-1 incubadas con (0.25–1 µg/mL) de TWEAK solo o combinado con un anticuerpo anti-Fn14 (1–5 µg/mL) durante 72 horas.

C) Efecto del silenciamiento de HMGB1 sobre la inducción de la secreción de MCP-1 mediada por TWEAK en células monocíticas. Imagen representativa de un western blot que muestra la expresión intracelular de HMGB1 en monocitos THP-1 transfectados con un ARN pequeño de interferencia contra HMGB1 o control, y en presencia de TWEAK (0.5 µg/mL). Las células se recogieron a las 72 horas tras la transfección y se estimularon con TWEAK recombinante durante 24 y 72 horas. Los sobrenadantes de las THP se utilizaron para hacer un ensayo de ELISA específico para MCP-1. Media ± DE de tres experimentos independientes \* $P < 0.05$  vs control; # $P < 0.05$  vs TWEAK.



#### IV.II.7 TWEAK modula la expresión génica y proteica de HMGB1 en las placas ateroscleróticas procedentes de ratones deficientes para ApoE

Recientemente hemos demostrado que la inyección sistémica de TWEAK incrementa la inflamación y el tamaño de la lesión aterosclerótica en ratones delecionados para ApoE hiperlipidémicos (Munoz-Garcia et al. 2009). Usando el mismo modelo animal, ratones inyectados con TWEAK mostraron un aumento de la expresión de HMGB1 en las placas ateroscleróticas presentes en el seno aórtico, comparados con ratones inyectados con salino ( $28 \pm 4.9\%$  de tinción positiva del área total versus  $16 \pm 2.7\%$  respectivamente;  $P < 0.05$ ; Figura 39A). Además los ratones tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TWEAK exhibieron una reducción en la expresión de HMGB1 si los comparamos con sus ratones control y los inyectados con una IgG inespecífica [ $7 \pm 1.2$  (anti-TWEAK) versus  $16 \pm 2.7$  (control); o  $14 \pm 1.9$  (IgG);  $P < 0.05$ ]. Estos resultados fueron confirmados con una PCR a tiempo real de la expresión del RNA mensajero de HMGB1 procedente de aorta total (Figura 39B). Tomando en consideración todos los datos obtenidos, TWEAK participa en la regulación de la expresión de HMGB1 tanto *in vitro* como *in vivo*.



**Figura 39. Efecto de TWEAK y del anticuerpo monoclonal anti-TWEAK en la expresión génica y proteica de HMGB1 en las placas ateroscleróticas avanzadas de ratones deficientes para ApoE.**

A) Fotografías representativas de inmunohistoquímicas de HMGB1 en el seno aórtico.

B) Análisis de PCR a tiempo real de la expresión del RNA mensajero de HMGB1 total de aorta procedente de ratones deficientes para ApoE tratados durante nueve días seguidos con salino (control), TWEAK (0.01 mg/kg/día), anti-TWEAK (1 mg/kg/día) o una IgG inespecífica (control negativo, 1 mg/kg/día). \* $P < 0.05$  VS control; † $P < 0.05$  versus el grupo IgG. Los valores mostrados se expresan como la media  $\pm$  EEM,  $n = 6$  por grupo. Escala: 50  $\mu$ m.





# DISCUSIÓN



### **V.1 La delección genética de TWEAK o su bloqueo terapéutico reduce la carga aterosclerótica y mejora la estabilidad de la placa en ratones ateroscleróticos espontáneos.**

El inicio, progresión y finalmente la rotura de la placa aterosclerótica implica un complejo mecanismo patológico. La búsqueda e identificación de las causas subyacentes así como de un tratamiento eficaz, constituye hoy el mayor reto en la medicina vascular actual. Gracias a la utilización de un modelo murino de aterosclerosis bien validado, hemos obtenido unos resultados que demuestran claramente que TWEAK participa en el desarrollo, progresión e inestabilidad de la placa aterosclerótica.

El estudio y la comparación mediante diferentes técnicas de proteómica de medios condicionados procedentes de fragmentos de arterias mamarias sanas y de endarterectomías de arterias carótidas ateroscleróticas, permitió, gracias a las diferencias encontradas en los patrones de liberación, identificar a TWEAK como una citoquina implicada en la patología aterosclerótica (Blanco-Colio, 2007). La confirmación posterior de que TWEAK se expresaba en los macrófagos y las CMLV del interior de las placas ateroscleróticas carotídeas humanas (Munoz-Garcia, Martin-Ventura, Martinez, Sanchez, Hernandez, Ortega, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2006), no hizo sino confirmar el nexo entre esta citoquina y la enfermedad aterosclerótica. A partir de estos resultados, nuestro grupo se preguntó cuáles serían los efectos de una sobrecarga de TWEAK circulante sobre las placas ateroscleróticas preexistentes (Munoz-Garcia, Moreno, Lopez-Franco, Sanz, Martin-Ventura, Blanco, Jakubowski, Burkly, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2009). Para ello realizamos un modelo animal con dieta al que inyectamos una dosis conocida de TWEAK durante 10 días. La conclusión de ese estudio fue que TWEAK ejerce un efecto nocivo en las lesiones ateroscleróticas aumentando por un lado el tamaño de la lesión y por otro la respuesta inflamatoria dentro de la placa, representada principalmente por un aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B que se tradujo en un incremento de la expresión de las quimioquinas MCP-1 y RANTES que a su vez provocó un aumento del número total de macrófagos presentes en la placa. Una vez que ratificamos que el aumento de TWEAK agravaba significativamente las lesiones ateroscleróticas, quisimos averiguar qué efectos tendría si lo disminuíamos, lo cual nos condujo directamente al estudio que da origen a esta tesis.

Para bloquear los efectos de TWEAK existen diferentes abordajes terapéuticos como anticuerpos contra TWEAK o contra Fn14, antagonistas del receptor o inhibidores permeables de las cascadas de señalización. De todos ellos escogimos el anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK ya que es un anticuerpo que actualmente se encuentra en fase 2 de ensayo clínico para LUPUS y fase 1 para artritis reumatoide. Además del abordaje terapéutico generamos ratones doble

deficientes para TWEAK y ApoE con el fin de evaluar los efectos de la delección completa del gen y así poder compararlos con los del anticuerpo.

De acuerdo con estudios previos donde la inyección de TWEAK incrementaba y el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-TWEAK o con la proteína de fusión Fn14-fc disminuían el tamaño de la lesión en el seno aórtico de los ratones deficientes para ApoE (Schapira et al. 2009), los resultados del presente estudio demuestran que la delección o el bloqueo de TWEAK disminuyen considerablemente la carga aterosclerótica y el tamaño de las lesiones tempranas y avanzadas tanto en el seno aórtico como en las arterias braquiocefálicas de los ratones deficientes para ApoE estudiados. Además, los clásicos marcadores de las lesiones ateroscleróticas como los macrófagos, el contenido de células espumosas y la actividad gelatinolítica también se vieron reducidos en las lesiones ateroscleróticas, seguramente consecuencia de la disminución de la respuesta proinflamatoria asociada al desarrollo de la placa. Es importante destacar que dos de las principales cualidades que se utilizan para valorar las probabilidades de rotura de las placas ateroscleróticas, los cocientes colágeno/lípidos y CMLV/macrófagos, se incrementaron tanto en los ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE, como en los homocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE tratados con el anticuerpo anti-TWEAK, indicando que TWEAK juega un importante papel en la composición y por consiguiente en la inestabilidad de la placa aterosclerótica. Todos estos resultados sugieren que el bloqueo de TWEAK juega un doble papel ateroprotector en las placas ateroscleróticas avanzadas promoviendo por un lado efectos anti-inflamatorios y por otro incrementando las características relacionadas con la estabilidad de la placa, al menos en parte a través de los mecanismos dependientes de MMP.

Históricamente se ha dado mucha importancia al tamaño y grado de estenosis de la lesión a la hora de determinar la probabilidad de rotura de la placa y las complicaciones trombóticas subsiguientes, tales como el síndrome coronario agudo (Libby and Theroux 2005b). No obstante, no podemos obviar un rasgo aún más importante si cabe, que es la composición de la lesión. Los estudios patológicos muestran que las placas vulnerables e inestables se caracterizan por ser ricas en células inflamatorias y presentar una pérdida sustancial de CMLV y del contenido de colágeno (Davies et al. 1993;Virmani, Kolodgie, Burke, Farb, & Schwartz 2000).

En el presente estudio nuestro grupo ha demostrado que la delección de TWEAK o su bloqueo mediante un anticuerpo monoclonal inducen un cambio en la composición celular tanto en las placas tempranas como en las más estables y avanzadas. La presencia de CMLV se incrementó entre un 80% y un 70% y la infiltración macrofagocitaria disminuyó un 50% y un 40% en las lesiones tempranas y avanzadas de los senos aórticos respectivamente. La presencia de células espumosas en las lesiones del seno aórtico también se vio reducida por el bloqueo de TWEAK. Los mecanismos subyacentes a la

reducción del contenido de macrófagos por la delección de TWEAK o la terapia con anti-TWEAK posiblemente estén relacionados con la reducción de la expresión de quimioquinas inflamatorias. Se ha descrito que TWEAK incrementa la expresión de numerosas citoquinas proinflamatorias en CMLV y macrófagos cultivados incluyendo MCP-1, IL-8, IL-6 y RANTES (Kim et al. 2004; Munoz-Garcia, Moreno, Lopez-Franco, Sanz, Martin-Ventura, Blanco, Jakubowski, Burkly, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2009). La expresión de estas y otras citoquinas proinflamatorias está controlada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (de Winther, Kanters, Kraal, & Hofker 2005) y su activación se ha detectado en el núcleo de CMLV y macrófagos residentes en las placas ateroscleróticas humanas (Martin-Ventura et al. 2004), lo que prueba su participación en la desregulación de las CMLV en la aterosclerosis humana. Previamente nuestro grupo había demostrado que la inyección de TWEAK incrementa y que un tratamiento agudo (9 días) con anti-TWEAK disminuye la expresión de quimioquinas y la activación de NF- $\kappa$ B en las placas ateroscleróticas de ratón (Munoz-Garcia, Moreno, Lopez-Franco, Sanz, Martin-Ventura, Blanco, Jakubowski, Burkly, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2009). Ahora hemos probado que la inhibición prolongada y sostenida de la señalización por TWEAK es capaz de mantener la disminución de la expresión de las quimioquinas MCP-1 y RANTES así como la inactivación de NF- $\kappa$ B, lo cual sugiere un efecto continuado como resultado de la inhibición de TWEAK en la respuesta inflamatoria observada en las placas ateroscleróticas.

El papel de las metaloproteinasas (MMP) en la degradación del colágeno de las lesiones ateroscleróticas humanas próximas a la rotura ha sido ampliamente debatido en la literatura científica (Shah et al. 1995). De todos los componentes que toman parte en este lento proceso de destrucción los macrófagos residentes en la lesión son los que constituyen la fuente principal de secreción de MMP. En este trabajo hemos demostrado una notable disminución en la actividad gelatinolítica en lesiones ateroscleróticas estables procedentes tanto de ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE, como de ratones homocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE tratados con anti-TWEAK. Entre las dos gelatinasas conocidas, la actividad proteolítica observada en nuestro modelo animal debería estar relacionada con la actividad de MMP-9 ya que TWEAK incrementa la actividad de MMP-9 pero no de MMP-2 en macrófagos en cultivo (Kim, Kang, Kim, Woo, Lee, Kim, Park, Kwon, Park, & Lee 2004) si bien, no podemos descartar que otras MMP puedan estar también implicadas en la degradación de la matriz observada en nuestro modelo animal. Los mecanismos por los que la delección de TWEAK o la terapia con anti-TWEAK minimizan la actividad de la MMP-9 podrían ser atribuidos principalmente a la disminución del contenido de macrófagos pero también a la reducción de la actividad NF- $\kappa$ B ya que este factor de transcripción está implicado en la regulación de la expresión de múltiples MMP incluyendo la 9 (Bond et al. 2001). Esta menor actividad de las enzimas gelatinasas se traduce en un contenido de colágeno aproximadamente un 25% más alto en

las placas avanzadas procedentes de ratones TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, que en las de los ratones TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, debido probablemente a una consecuencia directa de la reducción de la infiltración y/o activación de los macrófagos y células espumosas secretoras de MMP. La delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK también fue capaz de retrasar laprogresión de la aterosclerosis, reduciendo notablemente los depósitos de lípidos en aproximadamente un 50% en las placas ateroscleróticas avanzadas presentes en ratones deficientes para ApoE. Esta disminución es probable que también esté relacionada con la reducción tanto de macrófagos como de células espumosas, pero también podría atribuirse al papel de TWEAK en la promoción de la absorción lipídica por los macrófagos; de hecho, Schapira et al (Schapira, Burkly, Zheng, Wu, Groeneweg, Rousch, Kockx, Daemen, & Heeneman 2009) a partir de un modelo murino tratado con una proteína de fusión anti FN14 (Fn14-fc) descubrieron que los macrófagos de los ratones tratados eran más pequeños y contenían menor carga lipídica que los macrófagos de los ratones control. Por consiguiente, la relación colágeno/lípidos se incrementó fuertemente en los ratones deficientes para TWEAK o tratados con anti-TWEAK, indicando claramente que TWEAK interviene en la inestabilidad asociada a la composición de la placa.

Para avanzar en el conocimiento del papel de TWEAK en la inestabilidad de la placa aterosclerótica, quisimos examinar si los efectos de la delección de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK obtenidos en el seno áortico también se repetían en la arteria braquiocefálica. Esta arteria es una de las tres ramificaciones del arco aórtico, da lugar a la carótida derecha y la subclavia derecha y constituye el sitio predilecto para la formación de placas ateroscleróticas avanzadas en los ratones deficientes para ApoE y además es el único lugar de toda la vasculatura del ratón en donde podemos encontrar placas ateroscleróticas con unas características fenotípicas lo más parecidas posible a las encontradas en una placa inestable humana (Johnson et al. 2005). Entre estas particularidades se incluyen un gran tamaño de la lesión, disminución de las CMLV y un incremento del contenido en macrófagos, así como la presencia de xantomas laterales, gran núcleo necrótico, fina capa fibrótica, evidencia de roturas de placa reparadas (cápsulas enterradas), alteraciones en la capa media, calcificación vascular y presencia de hemorragia intraplaca, sugiriendo que las lesiones presentes en la arterias braquiocefálicas murinas imitan algunos de los procesos que en los humanos culminan con la rotura de la placa (Rosenfeld, Polinsky, Virmani, Kauser, Rubanyi, & Schwartz 2000).

En el caso de las arterias braquiocefálicas la delección génica de TWEAK o el tratamiento con anti-TWEAK redujo tanto el tamaño de las placas ateroscleróticas como el porcentaje de oclusión luminal en los ratones deficientes para ApoE de 40 semanas. La demostración del efecto que el bloqueo de TWEAK ejerce sobre la estabilidad de la placa quedó aún más claro cuando estudiamos

los indicadores de vulnerabilidad de placa arriba mencionados en las arterias braquiocefálicas de los ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE y los homocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE tratados con anti-TWEAK. En este sentido, la delección de TWEAK o el tratamiento con el anticuerpo redujo la presencia de cápsulas enterradas y xantomas laterales cuya rotura da como resultado una hemorragia intraplaca (Rosenfeld, Polinsky, Virmani, Kauser, Rubanyi, & Schwartz 2000). En nuestro estudio, los ratones deficientes para ApoE de 40 semanas presentaron una alta frecuencia de hemorragia intraplaca (aproximadamente un 80%). Estos resultados concuerdan con los datos aportados por Rosenfeld *et al.* en donde observaron que más del 75% de los ratones deficientes para ApoE de entre 30 y 60 semanas experimentan hemorragia en el interior de la placa, de ahí la importancia de la reducción de este parámetro tanto en los ratones doble deficientes, como en los tratados con anti-TWEAK observada en nuestro estudio. Además la presencia incrementada de eritrocitos dentro de las placas está asociada con el fenotipo de placa inestable en humanos y también pueden contribuir directamente a la inestabilidad de la placa debido al alto contenido de colesterol en los mismos (Kolodgie et al. 2003; Lin et al. 2007; Michel et al. 2011).

Otra característica de placa inestable es la presencia de grandes núcleos necróticos y finas capas fibróticas que predisponen a la rotura (Virmani, Kolodgie, Burke, Farb, & Schwartz 2000). La frecuencia de los núcleos necróticos y de capas fibrosas en las arterias braquiocefálicas disminuyó en los ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE (TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) y en los ratones control (TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) tratados con anti-TWEAK comparados con los ratones control o los control tratados con IgG respectivamente si bien, estas diferencias no fueron significativas. Esto puede deberse al hecho de que en los ratones control, las placas con grandes núcleos necróticos progresan, transformándose en nódulos fibróticos en su mayor parte. Es interesante remarcar que estos nódulos presentan alta celularidad y la mayoría expresan marcadores de fenotipo condrocítico y osteoblástico (Rattazzi et al. 2005). Esta transformación de una placa con muchas zonas necróticas a nódulos fibróticos, se ve acompañada por la conversión de las CMLV residentes a células similares a condrocitos (Steitz, Speer, Curinga, Yang, Haynes, Aebersold, Schinke, Karsenty, & Giachelli 2001). En relación con este hecho, las células similares a condrocitos se ven reducidas en los ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE mientras que el contenido en calcio disminuyó tanto en los ratones doble deficientes como en los homocigotos para TWEAK y deficientes para ApoE tratados con el anticuerpo. Además, la formación de los nódulos fibróticos se acompaña de la invasión de la capa media por la placa dando lugar a un engrosamiento de la media (erosión de la media) (Rosenfeld, Averill, Bennett, & Schwartz 2008). En este sentido también hemos observado que la frecuencia de este tipo de erosión se redujo tanto en ratones doble deficientes como en los tratados con anti-TWEAK. Si a estos resultados obtenidos en la arteria braquiocefálica les sumamos una menor

actividad gelatinasa y unos cocientes CMLV/macrófagos y colágeno/lípidos aumentados podemos afirmar que la delección de TWEAK o su bloqueo retrasan la progresión e incrementan la estabilidad de las placas avanzadas presentes en los ratones deficientes para ApoE.

Por lo tanto nuestros datos no sólo apoyan el hecho de que TWEAK juega un importante papel en la formación e inestabilidad de la placa aterosclerótica, sino que demuestran que el bloqueo de las vías mediadas por TWEAK podría ser una nueva diana terapéutica para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis. Nuestros datos demuestran que el bloqueo de TWEAK mediante un anticuerpo monoclonal es capaz de mimetizar el fenotipo obtenido en los ratones deficientes previniendo las complicaciones de la aterosclerosis a través de la reducción de la respuesta inflamatoria y del reclutamiento macrofagocitario asociado, así como de incrementar la estabilidad de la placa a través de los mecanismos dependientes de MMP.

### **V.2 TWEAK aumenta la expresión y la secreción de HMGB1 tanto en monocitos cultivados como procedentes de placas ateroscleróticas humanas.**

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el apartado anterior, quisimos profundizar en los mecanismos que controlan la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK.

Además de sus conocidos efectos intranucleares como estabilizador de la cromatina, HMGB1 también puede actuar como estimulador de macrófagos y mediador proinflamatorio. No obstante, su implicación en la aterosclerosis no fue confirmada hasta la publicación de un estudio de Kalinina *et al.* en el que demostraban por un lado, la presencia de HMGB1 en el interior de las placas ateroscleróticas procedentes de aortas humanas y por otro lado, que la expresión de HMGB1 en macrófagos humanos puede modularse mediante citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Tomando en consideración estos datos y como cedores del importante efecto proinflamatorio de TWEAK quisimos analizar si éste era capaz de ejercer sobre la expresión y secreción de HMGB1 los mismos efectos observados en las otras citoquinas.

La vía TWEAK-Fn14 ha sido descrita como mediadora de diferentes procesos en el interior de la pared arterial patológica y tanto TWEAK como Fn14 están implicados en multitud de acciones durante el desarrollo de las placas ateroscleróticas tales como proliferación, inflamación, angiogénesis y apoptosis (Ortiz et al. 2009). Al igual que TWEAK y Fn14, HMGB1 también se expresa en las CMLV y los macrófagos, (Inoue et al. 2007; Munoz-Garcia, Martin-Ventura, Martinez, Sanchez, Hernandez, Ortega, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2006) los cuales representan la mayor fuente de HMGB1 en las lesiones ateroscleróticas presentes en las placas ateroscleróticas humanas (Kalinina, Agrotis, Antropova, DiVitto, Kanellakis, Kostolias, Ilyinskaya, Tararak, & Bobik 2004). En este estudio



advertimos una correlación positiva entre la expresión de HMGB1, TWEAK y Fn14 en las regiones correspondientes a los hombros de las placas ateroscleróticas procedentes de carótidas humanas, un área caracterizada por su alto contenido en macrófagos; lo cual indicaría que TWEAK está implicado en la regulación de HMGB1 en el interior de la pared vascular patológica. De hecho también observamos que TWEAK aumentó de manera tiempo y dosis-dependiente la expresión y la secreción de HMGB1 en monocitos humanos cultivados, tanto circulantes como inmortalizados (THP-1). Al igual que pasa con otras moléculas como el lipopolisacárido, el interferón- $\gamma$ , el TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , el tratamiento con TWEAK promovió la liberación de HMGB1 tras 48 horas de incubación. Un dato interesante es que la secreción de HMGB1 mediada por TWEAK está condicionada a la presencia de Fn14. Esta interacción la demostramos utilizando un anticuerpo bloqueante anti-Fn14 que previno el incremento observado en la secreción de HMGB1. Aparte del incremento del ARNm y de la liberación, nuestros experimentos evidenciaron que TWEAK también es capaz de modificar la distribución intracelular de HMGB1. Así los monocitos sin estimular o estimulados con un anticuerpo que bloqueaba el receptor canónico de TWEAK (anti-Fn14) presentaban una distribución de HMGB1 delimitada al núcleo, mientras que el HMGB1 de aquellos monocitos incubados con TWEAK se encontraba distribuido por todo el citoplasma. De este resultado se deduce que TWEAK induce la traslocación de HMGB1 del núcleo al citoplasma y que esta nueva distribución es necesaria para que se produzca su liberación y así pueda ejercer sus efectos proinflamatorios. Además los niveles intracelulares se mantuvieron constantes lo cual indica que la liberación de HMGB1 se asocia a un aumento de su síntesis. Tomando en consideración todas estas evidencias podemos afirmar que el sistema TWEAK-Fn14 regula la expresión de HMGB1 en monocitos/macrófagos.

Conviene recordar que los macrófagos son un grupo celular muy heterogéneo que agrupa diferentes poblaciones celulares entre las cuales se encuentran los macrófagos proinflamatorios o M1 y los antiinflamatorios o M2, los cuales se pueden diferenciar en base a sus características fenotípicas (Gordon and Taylor 2005). Esta polarización puede variar en función de la naturaleza del ambiente (Martinez et al. 2008). Los macrófagos M1 se infiltran en los tejidos en los primeros momentos tras el daño, aumentando así la respuesta proinflamatoria; mientras que los macrófagos M2 predominan durante las fases de reparación y muestran importantes propiedades antiinflamatorias (Mosser and Edwards 2008). Un estudio previo reveló que la polarización de los monocitos a macrófagos M1 y M2 atenúa la secreción de HMGB1 (Lolmede, Campana, Vezzoli, Bosurgi, Tonlorenzi, Clementi, Bianchi, Cossu, Manfredi, Brunelli, & Rovere-Querini 2009). Nuestros datos corroboran esta observación en el sentido que TWEAK aumentó tanto la expresión del ARNm como la secreción proteica de HGMB-1 en macrófagos M1, lo cual sugiere que TWEAK, a través de la liberación de HMGB1, estaría directamente implicado en la potenciación de la respuesta inflamatoria

asociada a macrófagos M1. La secreción de HMGB1 apareció asociada tanto a una elevación transitoria de sus niveles de ARNm, como a la traslocación del núcleo al citoplasma (Kalinina 2004).

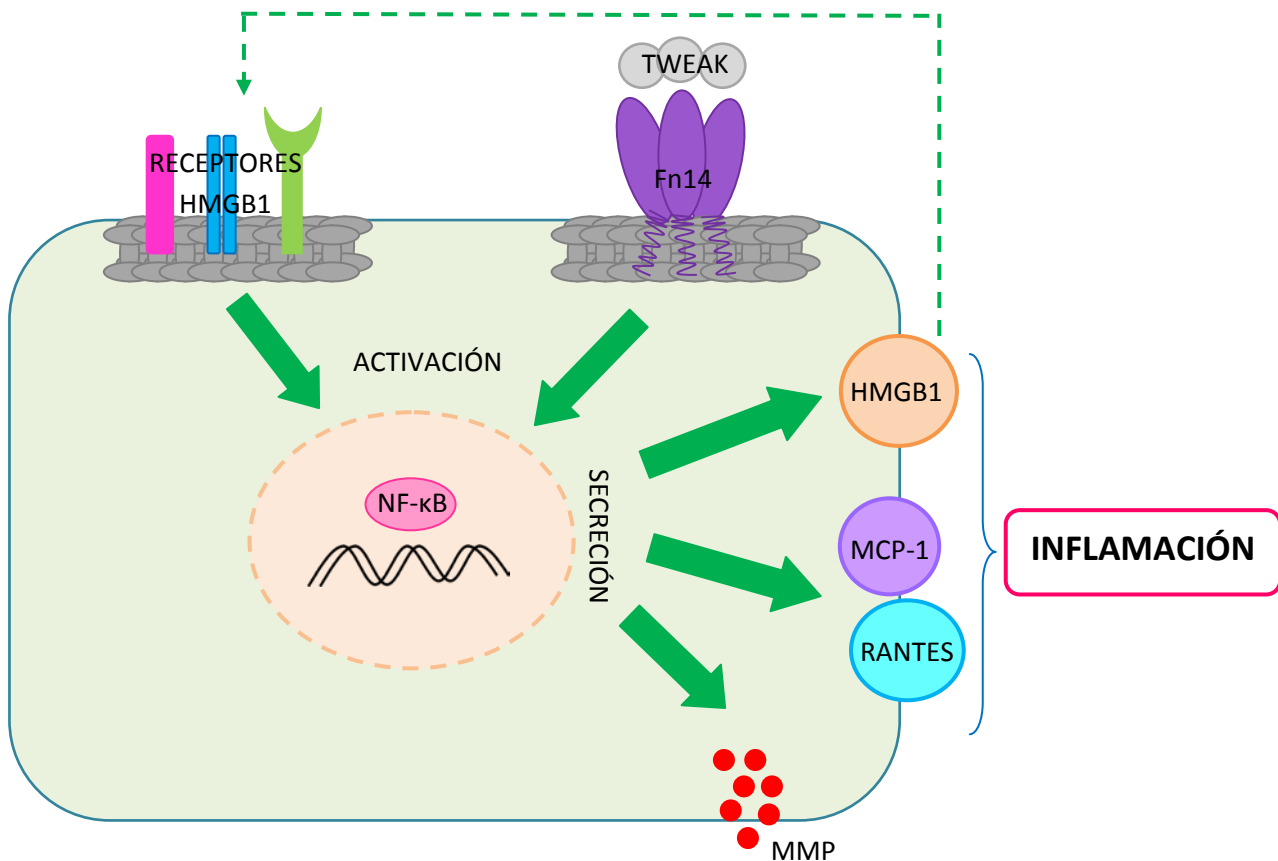
La expresión de HMGB1 se regula a través de ERK1/2, PKC, y PI3K/Akt (Kalinina 2004). Debido a que TWEAK-Fn14 ejerce muchas de sus acciones a través de las vías de señalización ERK1/2 o IP3/AKT, (Sanz, Sanchez-Nino, Izquierdo, Jakubowski, Justo, Blanco-Colio, Ruiz-Ortega, Egido, & Ortiz 2009) estudiamos el efecto del PD098059 (un inhibidor específico de las MAP quinasas) y la wortmanina (inhibidor de la quinasa IP3) sobre la secreción de HMGB1 mediada por TWEAK. Los resultados de estos experimentos mostraron que el inhibidor de la quinasa IP3 redujo la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK mientras que no se observó ningún efecto en la secreción de HMGB1 cuando añadimos PD098059 al medio de cultivo. Estos datos indican que la vía IP3/AKT, pero no ERK 1/2, constituye una señal específica implicada en el control de la liberación de HMGB1 mediada por TWEAK en monocitos. En contraste con el efecto observado con otras citoquinas (Kalinina 2004), nosotros hemos demostrado que NF- $\kappa$ B sí está específicamente implicado en la regulación de la secreción de HMGB1 en monocitos. Usando un inhibidor de este factor de transcripción, el partenolide, redujimos la secreción de HMGB1 inducida por TWEAK. Son muchos los estudios que han demostrado que la vía TWEAK-Fn14 desempeña muchas de sus funciones a través de la activación de NF- $\kappa$ B en distintos tipos celulares (Dogra et al. 2006; Li et al. 2009; Sanz et al. 2008). Además, TWEAK aumentó la activación de NF- $\kappa$ B en las placas ateroscleróticas presentes en el seno aórtico de los ratones deficientes para ApoE (Munoz-Garcia, Moreno, Lopez-Franco, Sanz, Martin-Ventura, Blanco, Jakubowski, Burkly, Ortiz, Egido, & Blanco-Colio 2009). El hecho de que NF- $\kappa$ B pueda regular la liberación de HMGB1 inducida por TWEAK es importante porque el HMGB1 secretado puede a su vez inducir la activación de NF- $\kappa$ B (Fiuza, Bustin, Talwar, Tropea, Gerstenberger, Shelhamer, & Suffredini 2003) aumentando la posibilidad de formar un bucle entre NF- $\kappa$ B y HMGB1 que cronifique los efectos vasculares proinflamatorios asociados a TWEAK (Ortiz, Sanz, Munoz, Moreno, Sanchez Nino, Martin-Ventura, Egido, & Blanco-Colio 2009). De hecho, una vez liberado al espacio intracelular, HMGB1 podría amplificar potencialmente las respuestas locales proinflamatorias aumentando la liberación de citoquinas y quimioquinas procedentes de los monocitos-macrófagos (Andersson, Wang, Palmblad, Aveberger, Bloom, Erlandsson-Harris, Janson, Kokkola, Zhang, Yang, & Tracey 2000).

HMGB1 también puede interactuar con las células endoteliales sobrerregulando los receptores de superficie/membrana e induciendo la secreción de mediadores solubles proinflamatorios (Luo et al. 2013). HMGB1 también es capaz de inducir la liberación de multitud de citoquinas proinflamatorias entre las que se incluye el TNF- $\alpha$ , MCP-1 y IL-6 (Fiuza; Andersson). Gracias a nuestra investigación y utilizando un ARN pequeño de interferencia de HMGB1,

observamos que HMGB1 también media la liberación de MCP-1 inducida por TWEAK en monocitos/macrófagos. Estos datos dan a entender que HMGB1 podría ser el mediador de la respuesta inflamatoria crónica inducida por TWEAK (Figura 40).

Por último analizamos las placas ateroscleróticas presentes en los senos aórticos de ratones deficientes para ApoE a los que les administramos TWEAK mediante una inyección sistémica. El resultado fue que la administración de TWEAK recombinante aumentó la expresión de HMGB1 en las placas ateroscleróticas de ratones deficientes para ApoE. La participación de TWEAK endógeno en la inflamación de la placa también quedó demostrada por la reducción de la expresión de HMGB1 en ratones deficientes para ApoE al aplicarles un tratamiento agudo con un anticuerpo monoclonal anti-TWEAK. Es importante recalcar que aunque el sistema TWEAK-Fn14 parece inducir la expresión de HMGB1 a través de las vías NF- $\kappa$ B y IP3/AKT, no podemos excluir que los anticuerpos neutralizantes puedan disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias y el reclutamiento de macrófagos en placas ateroscleróticas de ratones por otros mecanismos. No obstante, el hecho de que la respuesta observada durante el uso de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-HMGB1 en ratones deficientes para ApoE (Kanellakis et al. 2011), sea muy similar a la obtenida en el tratamiento con anti-TWEAK, sugiere que los efectos nocivos provocados por TWEAK pueden estar, al menos en parte, relacionados con HMGB1.

En conclusión, el presente estudio revela un nuevo papel de TWEAK dentro de la patología vascular al aumentar la expresión de HMGB1 y participar en la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo de la placa aterosclerótica.



**Figura 40. Papel de TWEAK en los diferentes mecanismos moleculares analizados.** Homotrímeros de TWEAK soluble se unen al receptor Fn14 desencadenando la activación del factor nuclear NF-κB. Esta acción da lugar a un aumento en la expresión y posterior secreción de numerosas citoquinas entre las que se encuentran RANTES, MCP-1 y HMGB1. Estas citoquinas a su vez atraerán a nuevos macrófagos que además secretarán metaloproteinasas. Paralelamente, una vez que HMGB1 es secretado, es capaz de unirse a diferentes receptores entre los que se encuentran RAGE, TLR-2 y TLR-4, lo cual conducirá a la activación de NF-κB por otra vía alternativa que tendrá como resultado la secreción de más MCP-1. La consecuencia de esta doble activación del factor de transcripción NF-κB es una cronificación de la inflamación producida principalmente por un exceso de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias.

# CONCLUSIONES



Durante el desarrollo de esta tesis hemos analizado el papel de la citoquina proinflamatoria TWEAK en el desarrollo y progresión de las placas ateroscleróticas; así como su papel como modulador de la inflamación propia de esta patología. Las conclusiones finales de nuestra investigación son las siguientes:

- 1-. La delección génica de TWEAK reduce la carga aterosclerótica y el tamaño de la lesión en diferentes territorios vasculares, tanto en estadios tempranos como avanzados.
- 2-. La delección génica de TWEAK varía la composición de las placas ateroscleróticas tempranas y avanzadas disminuyendo el contenido lipídico y aumentando la cantidad de colágeno haciéndolas más estables y por lo tanto, menos propensas a la rotura.
- 3-. La delección génica de TWEAK disminuye la respuesta inflamatoria tanto a nivel sistémico, como la que tiene lugar en el interior de las placas ateroscleróticas. En esta respuesta inflamatoria se incluye el contenido total de macrófagos y células espumosas, la activación del factor nuclear de transcripción NFκ-B y la expresión de quimioquinas proinflamatorias como RANTES y MCP-1.
- 4-. El tratamiento terapéutico con anti-TWEAK es capaz de mimetizar el fenotipo genético obtenido en los ratones doble deficientes para TWEAK y Apoe de 40 semanas. Así, las placas ateroscleróticas avanzadas presentes en los ratones tratados con el anticuerpo mostraron todos los efectos obtenidos mediante la delección génica: menor carga aterosclerótica y tamaño de las lesiones, composición más estable y menor respuesta inflamatoria.
- 5-. La delección génica de TWEAK o el tratamiento terapéutico con anti-TWEAK reduce las características que promueven la rotura de las placas ateroscleróticas avanzadas: xantomas laterales, erosión medial, hemorragia intraplaca, cápsulas enterradas y células similares a condrocitos. La disminución de todos estos marcadores confiere a las placas ateroscleróticas una mayor estabilidad y por lo tanto son menos propensas a la rotura.
- 6-. La delección génica de TWEAK o el tratamiento terapéutico con anti-TWEAK disminuye la degradación gelatinolítica que tiene lugar en el interior de las placas ateroscleróticas avanzadas, aumentando su estabilidad y por lo tanto, haciéndolas menos vulnerables a la rotura.
- 7-. TWEAK aumenta la expresión génica y la secreción proteica de HMGB-1 tanto en monocitos humanos cultivados (circulantes e inmortalizados) como en placas ateroscleróticas de ratones

ateroscleróticos espontáneos. Este aumento en la secreción viene precedido por un cambio de cambio de compartimento celular desde el núcleo al citoplasma.

8-. Los efectos de TWEAK sobre la expresión y la secreción de HMGB1 están limitados a los macrófagos proinflamatorios M1.

9-. TWEAK estimula la secreción de la citoquina proinflamatoria MCP-1 en monocitos THP-1 a través de HMGB1.

10-. TWEAK controla la expresión de HMGB1 a través de NF- $\kappa$ B lo que pódrrconducir a la cronificación de la respuesta inflamatoria.

Por lo tanto esta tesis doctoral revela que TWEAK participa en el desarrollo de la lesión vascular aumentando el tamaño, la respuesta inflamatoria y la inestabilidad de las placas ateroscleróticas. Todos estos resultados ponen de manifiesto que el sistema TWEAK-Fn14 es una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la aterosclerosis.



- Alexopoulos, N. & Raggi, P. 2009. Calcification in atherosclerosis. *Nat.Rev.Cardiol.*, 6, (11) 681-688 available from: PM:19786983
- Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., & Tracey, K.J. 2002. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J.Leukoc.Biol.*, 72, (6) 1084-1091 available from: PM:12488489
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., & Tracey, K.J. 2000. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J.Exp.Med.*, 192, (4) 565-570 available from: PM:10952726
- Ando, T., Ichikawa, J., Wako, M., Hatsushika, K., Watanabe, Y., Sakuma, M., Tasaka, K., Ogawa, H., Hamada, Y., Yagita, H., & Nakao, A. 2006. TWEAK/Fn14 interaction regulates RANTES production, BMP-2-induced differentiation, and RANKL expression in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Arthritis Res.Ther.*, 8, (5) R146 available from: PM:16945157
- Bodmer, J.L., Schneider, P., & Tschopp, J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci.*, 27, (1) 19-26 available from: PM:11796220
- Bond, M., Chase, A.J., Baker, A.H., & Newby, A.C. 2001. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc.Res.*, 50, (3) 556-565 available from: PM:11376631
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., & Schneider, P. 2006. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J.Biol.Chem.*, 281, (20) 13964-13971 available from: PM:16547002
- Bourcier, T., Sukhova, G., & Libby, P. 1997. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J.Biol.Chem.*, 272, (25) 15817-15824 available from: PM:9188479
- Bover, L.C., Cardo-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., Aggarwal, B.B., Arap, W., & Pasqualini, R. 2007. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J.Immunol.*, 178, (12) 8183-8194 available from: PM:17548657
- Burke, A.P., Kolodgie, F.D., Farb, A., Weber, D.K., Malcom, G.T., Smialek, J., & Virmani, R. 2001. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*, 103, (7) 934-940 available from: PM:11181466

- Campbell, S., Burkly, L.C., Gao, H.X., Berman, J.W., Su, L., Browning, B., Zheng, T., Schiffer, L., Michaelson, J.S., & Putterman, C. 2006. Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells. *J.Immunol.*, 176, (3) 1889-1898 available from: PM:16424220
- Cannon, J.G. 2000. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci.*, 15, 298-303 available from: PM:11390930
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., & Demers, L.M. 1999. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin.Chem.*, 45, (1) 7-17 available from: PM:9895331
- Chen, Z.J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat.Cell Biol.*, 7, (8) 758-765 available from: PM:16056267
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., & Browning, J.L. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 272, (51) 32401-32410 available from: PM:9405449
- Chicheportiche, Y., Fossati-Jimack, L., Moll, S., Ibnou-Zekri, N., & Izui, S. 2000. Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 279, (1) 162-165 available from: PM:11112433
- Choi, S.Y. & Mintz, G.S. 2010. What have we learned about plaque rupture in acute coronary syndromes? *Curr.Cardiol.Rep.*, 12, (4) 338-343 available from: PM:20425160
- Cuhlmann, S., Van der Heiden, K., Saliba, D., Tremoleda, J.L., Khalil, M., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong, I.A., Mason, J.C., Udalova, I., Gsell, W., Jones, H., Haskard, D.O., Krams, R., & Evans, P.C. 2011. Disturbed blood flow induces RelA expression via c-Jun N-terminal kinase 1: a novel mode of NF-kappaB regulation that promotes arterial inflammation. *Circ.Res.*, 108, (8) 950-959 available from: PM:21350211
- Davies, M.J., Richardson, P.D., Woolf, N., Katz, D.R., & Mann, J. 1993. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br.Heart J.*, 69, (5) 377-381 available from: PM:8518056
- de Winther, M.P., Kanters, E., Kraal, G., & Hofker, M.H. 2005. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, (5) 904-914 available from: PM:15731497

- Desplat-Jego, S., Creidy, R., Varriale, S., Allaire, N., Luo, Y., Bernard, D., Hahm, K., Burkly, L., & Boucraut, J. 2005. Anti-TWEAK monoclonal antibodies reduce immune cell infiltration in the central nervous system and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin.Immunol.*, 117, (1) 15-23 available from: PM:16027043
- Dogra, C., Changotra, H., Mohan, S., & Kumar, A. 2006. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor-kappaB and degradation of MyoD protein. *J.Biol.Chem.*, 281, (15) 10327-10336 available from: PM:16461349
- Dogra, C., Hall, S.L., Wedhas, N., Linkhart, T.A., & Kumar, A. 2007. Fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes. Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J.Biol.Chem.*, 282, (20) 15000-15010 available from: PM:17383968
- Donohue, P.J., Richards, C.M., Brown, S.A., Hanscom, H.N., Buschman, J., Thangada, S., Hla, T., Williams, M.S., & Winkles, J.A. 2003. TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, (4) 594-600 available from: PM:12615668
- Falk, E. 1991. Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations. *Am.J.Cardiol.*, 68, (7) 28B-35B available from: PM:1892065
- Felli, N., Pedini, F., Zeuner, A., Petrucci, E., Testa, U., Conticello, C., Biffoni, M., Di, C.A., Winkles, J.A., Peschle, C., & De, M.R. 2005. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J.Immunol.*, 175, (3) 1464-1472 available from: PM:16034083
- Feng, S.L., Guo, Y., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., Bell, D.W., Testa, J.R., Peifley, K.A., & Winkles, J.A. 2000. The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *Am.J.Pathol.*, 156, (4) 1253-1261 available from: PM:10751351
- Fernandez-Ortiz, A., Badimon, J.J., Falk, E., Fuster, V., Meyer, B., Mailhac, A., Weng, D., Shah, P.K., & Badimon, L. 1994. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 23, (7) 1562-1569 available from: PM:8195515
- Fiuza, C., Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., Shelhamer, J.H., & Suffredini, A.F. 2003. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, 101, (7) 2652-2660 available from: PM:12456506

Girgenrath, M., Weng, S., Kostek, C.A., Browning, B., Wang, M., Brown, S.A., Winkles, J.A., Michaelson, J.S., Allaire, N., Schneider, P., Scott, M.L., Hsu, Y.M., Yagita, H., Flavell, R.A., Miller, J.B., Burkly, L.C., & Zheng, T.S. 2006. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.*, 25, (24) 5826-5839 available from: PM:17124496

Goodwin, G.H., Sanders, C., & Johns, E.W. 1973. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur.J.Biochem.*, 38, (1) 14-19 available from: PM:4774120

Gordon, S. & Taylor, P.R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, (12) 953-964 available from: PM:16322748

Hacker, H. & Karin, M. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci.STKE.*, 2006, (357) re13 available from: PM:17047224

Handel, M.L. & Girgis, L. 2001. Transcription factors. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.*, 15, (5) 657-675 available from: PM:11812014

Harris, H.E., Andersson, U., & Pisetsky, D.S. 2012. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat.Rev.Rheumatol.*, 8, (4) 195-202 available from: PM:22293756

Hayden, M.S. & Ghosh, S. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, 18, (18) 2195-2224 available from: PM:15371334

Hernandez-Presa, M.A., Gomez-Guerrero, C., & Egido, J. 1999. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int.*, 55, (1) 209-214 available from: PM:9893129

Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J.X., Nagashima, M., Lundh, E.R., Vijay, S., Nitecki, D., & . 1995. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J.Biol.Chem.*, 270, (43) 25752-25761 available from: PM:7592757

Huttunen, H.J., Fages, C., & Rauvala, H. 1999. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J.Biol.Chem.*, 274, (28) 19919-19924 available from: PM:10391939

- Inoue, K., Kawahara, K., Biswas, K.K., Ando, K., Mitsudo, K., Nobuyoshi, M., & Maruyama, I. 2007. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc.Pathol.*, 16, (3) 136-143 available from: PM:17502242
- Ishihara, K., Tsutsumi, K., Kawane, S., Nakajima, M., & Kasaoka, T. 2003. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett.*, 550, (1-3) 107-113 available from: PM:12935895
- Johnson, J., Carson, K., Williams, H., Karanam, S., Newby, A., Angelini, G., George, S., & Jackson, C. 2005. Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment. *Circulation*, 111, (11) 1422-1430 available from: PM:15781753
- Kalinina, N., Agrotis, A., Antropova, Y., DiVitto, G., Kanellakis, P., Kostolias, G., Ilyinskaya, O., Tararak, E., & Bobik, A. 2004. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 24, (12) 2320-2325 available from: PM:15374849
- Kanellakis, P., Agrotis, A., Kyaw, T.S., Koulis, C., Ahrens, I., Mori, S., Takahashi, H.K., Liu, K., Peter, K., Nishibori, M., & Bobik, A. 2011. High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 31, (2) 313-319 available from: PM:21088249
- Kawakita, T., Shiraki, K., Yamanaka, Y., Yamaguchi, Y., Saitou, Y., Enokimura, N., Yamamoto, N., Okano, H., Sugimoto, K., Murata, K., & Nakano, T. 2004. Functional expression of TWEAK in human hepatocellular carcinoma: possible implication in cell proliferation and tumor angiogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 318, (3) 726-733 available from: PM:15144899
- Kawakita, T., Shiraki, K., Yamanaka, Y., Yamaguchi, Y., Saitou, Y., Enokimura, N., Yamamoto, N., Okano, H., Sugimoto, K., Murata, K., & Nakano, T. 2005. Functional expression of TWEAK in human colonic adenocarcinoma cells. *Int.J.Oncol.*, 26, (1) 87-93 available from: PM:15586228
- Kazama, H., Ricci, J.E., Herndon, J.M., Hoppe, G., Green, D.R., & Ferguson, T.A. 2008. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity.*, 29, (1) 21-32 available from: PM:18631454
- Kim, S.H., Kang, Y.J., Kim, W.J., Woo, D.K., Lee, Y., Kim, D.I., Park, Y.B., Kwon, B.S., Park, J.E., & Lee, W.H. 2004. TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ.J.*, 68, (4) 396-399 available from: PM:15056843

Kolodgie, F.D., Gold, H.K., Burke, A.P., Fowler, D.R., Kruth, H.S., Weber, D.K., Farb, A., Guerrero, I.J., Hayase, M., Kutys, R., Narula, J., Finn, A.V., & Virmani, R. 2003. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N.Engl.J.Med.*, 349, (24) 2316-2325 available from: PM:14668457

Kutuk, O. & Basaga, H. 2003. Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol.Med.*, 9, (12) 549-557 available from: PM:14659470

Lafont, A. 2003. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart*, 89, (10) 1262-1267 available from: PM:12975444

Lander, H.M., Tauras, J.M., Ogiste, J.S., Hori, O., Moss, R.A., & Schmidt, A.M. 1997. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J.Biol.Chem.*, 272, (28) 17810-17814 available from: PM:9211935

Lee, J.I. & Burckart, G.J. 1998. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J.Clin.Pharmacol.*, 38, (11) 981-993 available from: PM:9824778

Li, H., Mittal, A., Paul, P.K., Kumar, M., Srivastava, D.S., Tyagi, S.C., & Kumar, A. 2009. Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappaB-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: a potential role of MMP-9 in myopathy. *J.Biol.Chem.*, 284, (7) 4439-4450 available from: PM:19074147

Li, J.J. & Fang, C.H. 2004. Atheroscleritis is a more rational term for the pathological entity currently known as atherosclerosis. *Med.Hypotheses*, 63, (1) 100-102 available from: PM:15193358

Libby, P. & Theroux, P. 2005a. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111, (25) 3481-3488 available from: PM:15983262

Libby, P. & Theroux, P. 2005b. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111, (25) 3481-3488 available from: PM:15983262

Lin, H.L., Xu, X.S., Lu, H.X., Zhang, L., Li, C.J., Tang, M.X., Sun, H.W., Liu, Y., & Zhang, Y. 2007. Pathological mechanisms and dose dependency of erythrocyte-induced vulnerability of atherosclerotic plaques. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 43, (3) 272-280 available from: PM:17628589

Locksley, R.M., Killeen, N., & Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, (4) 487-501 available from: PM:11239407

- Lolmede, K., Campana, L., Vezzoli, M., Bosurgi, L., Tonlorenzi, R., Clementi, E., Bianchi, M.E., Cossu, G., Manfredi, A.A., Brunelli, S., & Rovere-Querini, P. 2009. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate H. J.Leukoc.Biol., 85, (5) 779-787 available from: PM:19197071
- Lotze, M.T. & Tracey, K.J. 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat.Rev.Immunol., 5, (4) 331-342 available from: PM:15803152
- Luo, Y., Li, S.J., Yang, J., Qiu, Y.Z., & Chen, F.P. 2013. HMGB1 induces an inflammatory response in endothelial cells via the RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress pathway. Biochem.Biophys.Res.Comm., 438, (4) 732-738 available from: PM:23911608
- Mann, J. & Davies, M.J. 1999. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. Heart, 82, (3) 265-268 available from: PM:10455072
- Martin-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L.M., Munoz-Garcia, B., Gomez-Hernandez, A., Arribas, A., Ortega, L., Tunon, J., & Egido, J. 2004. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. Stroke, 35, (2) 458-463 available from: PM:14739407
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. 2008. Macrophage activation and polarization. Front Biosci., 13, 453-461 available from: PM:17981560
- Meighan-Mantha, R.L., Hsu, D.K., Guo, Y., Brown, S.A., Feng, S.L., Peifley, K.A., Alberts, G.F., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Richards, C.M., & Winkles, J.A. 1999. The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. J.Biol.Chem., 274, (46) 33166-33176 available from: PM:10551889
- Michel, J.B., Virmani, R., Arbustini, E., & Pasterkamp, G. 2011. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. Eur.Heart J., 32, (16) 1977-85, 1985a, 1985b, 1985c available from: PM:21398643
- Monaco, C., Andreaskos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., Cheshire, N., Paleolog, E., & Feldmann, M. 2004. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 101, (15) 5634-5639 available from: PM:15064395
- Moreno, J.A., Munoz-Garcia, B., Martin-Ventura, J.L., Madrigal-Matute, J., Orbe, J., Paramo, J.A., Ortega, L., Egido, J., & Blanco-Colio, L.M. 2009a. The CD163-expressing macrophages recognize and

internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 207, (1) 103-110 available from: PM:19473660

Moreno, J.A., Munoz-Garcia, B., Martin-Ventura, J.L., Madrigal-Matute, J., Orbe, J., Paramo, J.A., Ortega, L., Egido, J., & Blanco-Colio, L.M. 2009b. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 207, (1) 103-110 available from: PM:19473660

Mosser, D.M. & Edwards, J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.Rev.Immunol.*, 8, (12) 958-969 available from: PM:19029990

Munoz-Garcia, B., Martin-Ventura, J.L., Martinez, E., Sanchez, S., Hernandez, G., Ortega, L., Ortiz, A., Egido, J., & Blanco-Colio, L.M. 2006. Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke*, 37, (8) 2044-2053 available from: PM:16809572

Munoz-Garcia, B., Moreno, J.A., Lopez-Franco, O., Sanz, A.B., Martin-Ventura, J.L., Blanco, J., Jakubowski, A., Burkly, L.C., Ortiz, A., Egido, J., & Blanco-Colio, L.M. 2009. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE-knockout mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 29, (12) 2061-2068 available from: PM:19778942

Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S.W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J.J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., Fayad, Z., Stone, P.H., Waxman, S., Raggi, P., Majid, M., Zarrabi, A., Burke, A., Yuan, C., Fitzgerald, P.J., Siscovick, D.S., de Korte, C.L., Aikawa, M., Juhani Airaksinen, K.E., Assmann, G., Becker, C.R., Chesebro, J.H., Farb, A., Galis, Z.S., Jackson, C., Jang, I.K., Koenig, W., Lodder, R.A., March, K., Demirovic, J., Navab, M., Priori, S.G., Rekhter, M.D., Bahr, R., Grundy, S.M., Mehran, R., Colombo, A., Boerwinkle, E., Ballantyne, C., Insull, W., Jr., Schwartz, R.S., Vogel, R., Serruys, P.W., Hansson, G.K., Faxon, D.P., Kaul, S., Drexler, H., Greenland, P., Muller, J.E., Virmani, R., Ridker, P.M., Zipes, D.P., Shah, P.K., & Willerson, J.T. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 108, (14) 1664-1672 available from: PM:14530185

Newby, A.C. 2008. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 28, (12) 2108-2114 available from: PM:18772495



- Ortiz, A., Sanz, A.B., Munoz, G.B., Moreno, J.A., Sanchez Nino, M.D., Martin-Ventura, J.L., Egido, J., & Blanco-Colio, L.M. 2009. Considering TWEAK as a target for therapy in renal and vascular injury. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20, (3) 251-258 available from: PM:19482507
- Pamukcu, B., Lip, G.Y., Devitt, A., Griffiths, H., & Shantsila, E. 2010. The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease. *Ann.Med.*, 42, (6) 394-403 available from: PM:20568979
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., & Abraham, E. 2004. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J.Biol.Chem.*, 279, (9) 7370-7377 available from: PM:14660645
- Peter, M.E. & Krammer, P.H. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death.Differ.*, 10, (1) 26-35 available from: PM:12655293
- Phillips, T.A., Ni, J., & Hunt, J.S. 2001. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placenta, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. *Placenta*, 22, (8-9) 663-672 available from: PM:11597186
- Rattazzi, M., Bennett, B.J., Bea, F., Kirk, E.A., Ricks, J.L., Speer, M., Schwartz, S.M., Giachelli, C.M., & Rosenfeld, M.E. 2005. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, (7) 1420-1425 available from: PM:15845913
- Rekhter, M.D. 2002. How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? *Cardiovasc.Res.*, 54, (1) 36-41 available from: PM:12062359
- Roos, C., Wicovsky, A., Muller, N., Salzmann, S., Rosenthal, T., Kalthoff, H., Trauzold, A., Seher, A., Henkler, F., Kneitz, C., & Wajant, H. 2010. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J.Immunol.*, 185, (3) 1593-1605 available from: PM:20610643
- Rosenfeld, M.E., Averill, M.M., Bennett, B.J., & Schwartz, S.M. 2008. Progression and disruption of advanced atherosclerotic plaques in murine models. *Curr.Drug Targets.*, 9, (3) 210-216 available from: PM:18336239
- Rosenfeld, M.E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G., & Schwartz, S.M. 2000. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20, (12) 2587-2592 available from: PM:11116057

Ruffer M.A. On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 B.C. -525 A.D.). 15[The Journal of Pathology and Bacteriology], 453-462. 1911.

Sanz, A.B., Justo, P., Sanchez-Nino, M.D., Blanco-Colio, L.M., Winkles, J.A., Kreztler, M., Jakubowski, A., Blanco, J., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., & Ortiz, A. 2008. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 19, (4) 695-703 available from: PM:18235096

Sanz, A.B., Sanchez-Nino, M.D., Izquierdo, M.C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L.M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., & Ortiz, A. 2009. Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J.Cell Mol.Med.*, 13, (9B) 3329-3342 available from: PM:19426154

Schapira, K., Burkly, L.C., Zheng, T.S., Wu, P., Groeneweg, M., Rousch, M., Kockx, M.M., Daemen, M.J., & Heeneman, S. 2009. Fn14-Fc fusion protein regulates atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice and inhibits macrophage lipid uptake in vitro. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 29, (12) 2021-2027 available from: PM:19762780

Semov, A., Semova, N., Lacelle, C., Marcotte, R., Petroulakis, E., Proestou, G., & Wang, E. 2002. Alterations in TNF- and IL-related gene expression in space-flown WI38 human fibroblasts. *FASEB J.*, 16, (8) 899-901 available from: PM:12039873

Shah, P.K., Falk, E., Badimon, J.J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J.T., Regnstrom, J., & Fuster, V. 1995. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*, 92, (6) 1565-1569 available from: PM:7664441

Steitz, S.A., Speer, M.Y., Curinga, G., Yang, H.Y., Haynes, P., Aebersold, R., Schinke, T., Karsenty, G., & Giachelli, C.M. 2001. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ.Res.*, 89, (12) 1147-1154 available from: PM:11739279

Stoll, G. & Bendszus, M. 2006. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*, 37, (7) 1923-1932 available from: PM:16741184

Suo, J., Ferrara, D.E., Sorescu, D., Guldberg, R.E., Taylor, W.R., & Giddens, D.P. 2007. Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 27, (2) 346-351 available from: PM:17122449

- Tak, P.P. & Firestein, G.S. 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J.Clin.Invest*, 107, (1) 7-11 available from: PM:11134171
- Thompson, R.C., Allam, A.H., Lombardi, G.P., Wann, L.S., Sutherland, M.L., Sutherland, J.D., Soliman, M.A., Frohlich, B., Mininberg, D.T., Monge, J.M., Vallodolid, C.M., Cox, S.L., Abd El-Maksoud, G., Badr, I., Miyamoto, M.I., El-Halim Nur El-Din, Narula, J., Finch, C.E., & Thomas, G.S. 2013. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet* available from: PM:23489753
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J.T., Gertz, S.D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., & Badimon, J.J. 1997. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 95, (3) 594-599 available from: PM:9024145
- Viles-Gonzalez, J.F., Fuster, V., & Badimon, J.J. 2006. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. *Curr.Mol.Med.*, 6, (5) 489-499 available from: PM:16918370
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., & Schwartz, S.M. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20, (5) 1262-1275 available from: PM:10807742
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A., & Tracey, K.J. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285, (5425) 248-251 available from: PM:10398600
- Weber, C. & Noels, H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat.Med.*, 17, (11) 1410-1422 available from: PM:22064431
- Weinberg, P.D. & Ross, E.C. 2007. Twenty-fold difference in hemodynamic wall shear stress between murine and human aortas. *J.Biomech.*, 40, (7) 1594-1598 available from: PM:17046000
- Wiley, S.R., Cassiano, L., Lofton, T., Davis-Smith, T., Winkles, J.A., Lindner, V., Liu, H., Daniel, T.O., Smith, C.A., & Fanslow, W.C. 2001. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity.*, 15, (5) 837-846 available from: PM:11728344
- Wiley, S.R. & Winkles, J.A. 2003. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14, (3-4) 241-249 available from: PM:12787562

- Williams, H., Johnson, J.L., Carson, K.G., & Jackson, C.L. 2002. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 22, (5) 788-792 available from: PM:12006391
- Winkles, J.A. 2008. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 7, (5) 411-425 available from: PM:18404150
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem.Sci.*, 29, (2) 72-79 available from: PM:15102433
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H.S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., Akira, S., Bierhaus, A., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., & Tracey, K.J. 2010. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107, (26) 11942-11947 available from: PM:20547845
- Zernecke, A. & Weber, C. 2010. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc.Res.*, 86, (2) 192-201 available from: PM:20007309
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., & Maeda, N. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258, (5081) 468-471 available from: PM:1411543

**ANEXOS**



**Publicaciones derivadas de la tesis:**

Sastre C, Fernandez-Laso V, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, Moreno J, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Burkly LC, Egido J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM. Genetic deletion or TWEAK blocking antibody administration reduce atherosclerosis and enhance plaque stability in mice. J Cell Mod Med 2013 (under review).

Moreno JA, Sastre C, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, Ortega L, Burkly LC, Egido J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM. HMGB1 expression and secretion are increased via TWEAK-Fn14 interaction in atherosclerotic plaques and cultured monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33:612-20.

Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Martín-Ventura JL, López-Franco O, Sastre C, Ortega L, Burkly LC, Egido J, Blanco-Colio LM. TWEAK-Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res. 2011;89:225-33

**Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis:**

Moreno JA, Moreno S, Rubio-Navarro A, Sastre C, Blanco-Colio LM, Gómez-Guerrero C, Ortiz A, Egido J. Targeting chemokines in proteinuria-induced renal disease. Expert Opin Ther Targets. 2012 Aug;16(8):833-45.

Sastre C, Rubio-Navarro A, Buendía I, Gómez-Guerrero C, Blanco J, Mas S, Egido J, Blanco-Colio LM, Moreno JA. Hyperlipidemia-associated renal damage decreases Klotho expression in kidneys from ApoE knockout mice (enviado a publicar a Plos One)





**Genetic deletion and therapeutic blockade of TWEAK reduce atherosclerosis and enhance plaque stability in mice**

Journal:	<i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i>
Manuscript ID:	JCMM-07-2013-005
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	04-Jul-2013
Complete List of Authors:	Sastre, Cristina; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Fernandez-Laso, Valvanera; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Madrigal-Matute, Julio; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Muñoz-García, Begoña; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Moreno, Juan; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Pastor-Vargas, Carlos; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Burkly, Linda; Biogen Idec, Immunology Egido, Jesus ; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Martin-Ventura, Jose Luis ; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab Blanco-Colio, Luis; IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Vascular Research Lab
Keywords:	Atherosclerosis, Inflammation, Stability, TWEAK

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Genetic deletion and therapeutic blockade of TWEAK reduce atherosclerosis  
and enhance plaque stability in mice**

Cristina Sastre, Valvanera Fernández-Laso, Julio Madrigal-Matute, Begoña Muñoz-  
García, Juan A. Moreno, Carlos Pastor-Vargas, Linda C. Burkly \*, Jesús Egido, Jose  
L. Martín-Ventura, Luis M. Blanco-Colio.

Lab. Patología Vascular. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Spain.

\* Biogen Idec. Cambridge. Massachusetts. EEUU.

Vascular Research Lab. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Autónoma University. Madrid.  
Spain.

Biogen Idec. Cambridge. Massachusetts. USA.

**Short Title:** TWEAK inhibition enhances plaque stability

**Key words:** TWEAK, atherosclerosis, inflammation, stability

Address correspondence to:

Luis M. Blanco-Colio, PhD. Vascular Reseach Lab. IIS-Fundación Jiménez Díaz

Av. Reyes Católicos 2. 28040-Madrid. Spain

Email: [lblanco@fjd.es](mailto:lblanco@fjd.es)

## Abstract

Clinical complications associated with atherosclerotic plaques arise from luminal obstruction due to plaque growth or destabilization leading to rupture. TWEAK is a proinflammatory cytokine that participates in atherosclerotic plaque development, but its role in plaque stability is unclear. Using two different approaches, genetic deletion of TWEAK and therapeutic treatment with a TWEAK blocking mAb in atherosclerosis-prone mice, we have analyzed the effect of TWEAK inhibition on atherosclerotic plaques progression and stability. Mice lacking both TWEAK and Apolipoprotein E (TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) exhibited a diminished atherosclerotic burden and lesion size in their aorta. Advanced atherosclerotic plaques of TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice exhibited a increase collagen/lipid and vascular smooth muscle cell/macrophage ratios compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> control mice, reflecting a more stable plaque phenotype. These changes are related with two different mechanisms, reduction of the inflammatory response (chemokines expression and secretion and NF-κB activation) and diminution of metalloproteinase activity in atherosclerotic plaques of TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>. A similar phenotype was observed with therapeutic anti-TWEAK mAb treatment in TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice. Brachiocephalic arteries were also examined since they exhibit additional features akin to human atherosclerotic plaques associated with instability and rupture. Features of greater plaque stability including augmented collagen/lipid ratio, reduced macrophage content, and less presence of lateral xanthomas, buried caps, medial erosion, intraplaque hemorrhage and calcium content were present in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK therapy in TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice.

Overall, our data indicate that anti-TWEAK therapy has the capacity to diminish proinflammatory response associated to atherosclerotic plaque progression and to alter

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

plaque morphology towards a stable phenotype.

For Peer Review

## Introduction

Atherosclerosis is a chronic disease affecting large arteries that involves the formation of plaques containing vascular and inflammatory cells, lipids and extracellular matrix [1]. Its complication arises through obstruction of the arterial lumen, leading to an ischemic event. Two different mechanisms have been proposed for this process: plaque growth leading to vessel stenosis, and/or formation of unstable plaques that acutely rupture, leading to an occlusive thrombus formation [2]. Despite great advances in the treatment of atherosclerosis, there is still a high mortality rate in these patients.

The inflammatory response in atherosclerotic plaques is characterized by recruitment of inflammatory cells, including T lymphocytes, monocytes/macrophages and neutrophils [3]. Both cell adhesion molecules and proinflammatory cytokines regulate the recruitment and activation of inflammatory cells within the injured vessel wall [4] during atherogenesis. Evidence suggests that proinflammatory cytokines also contribute to plaque instability. Inhibition of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [5], IL-18 [6], and IFN- $\gamma$  [7] in atheroprone mice promotes plaque stability by increasing collagen and reducing inflammatory cell content within atherosclerotic plaques. However, only a limited number of proinflammatory cytokines have been explored for causative roles in regulating features of plaque stability.

Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a proinflammatory cytokine belonging to TNF superfamily. TWEAK induces, through its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), a high number of physiological and pathological processes depending on cell type and environment [8]. Within the vasculature, TWEAK is expressed in non-atherosclerotic arteries [9-10],

while Fn14 is expressed at low levels or is absent in healthy tissues [9]. Interestingly, both TWEAK and Fn14 are expressed in different areas of human atherosclerotic plaques colocalizing with vascular smooth muscle cells (VSMC) and macrophages [9]. TWEAK is implicated in different processes associated with atherogenesis such as inflammation [11], proliferation and migration of VSMC [12], thrombosis [13] and angiogenesis [12-13]. We demonstrated that systemic administration of TWEAK aggravates atherosclerotic plaque development in the aortic root of apolipoprotein E (ApoE) knockout mice [14]. Furthermore, inhibition of Fn14 by an Fn14-Fc decoy protein reduces lesion size in atherosclerotic mice [15].

In the present paper, we aimed to fully assess the role of TWEAK in the formation of an unstable plaque phenotype. To do so we used ApoE<sup>-/-</sup> mice with genetic deficiency of TWEAK and analysed early and advanced atherosclerotic lesions present in their aortic root. Moreover, we explored whether therapeutic intervention with an anti-TWEAK mAb could protect mice from vascular inflammation and progression to an unstable plaque phenotype.

Certain characteristics of human atherosclerotic plaques, such as a greater lesion size, decreased smooth muscle content, increased macrophage number, and evidence of healed silent plaque rupture, are associated with instability and rupture [16] and similar phenotypic features are observed in unstable brachiocephalic atherosclerotic lesions of the ApoE<sup>-/-</sup> mice [17], suggesting that mouse lesions mimic at least some of the processes that culminate in plaque rupture in humans [18]. Brachiocephalic arteries from mice present features of plaque instability such as lateral xanthomas, buried caps, medial erosion, large necrotic core and calcification that are more evident than in the aortic root. For these reasons, we have tested the effect of TWEAK deletion or therapeutic anti-TWEAK treatment on features related

to plaque instability in brachiocephalic arteries of ApoE<sup>-/-</sup> mice.

For Peer Review

**Methods**

**Animals**

Female ApoE<sup>-/-</sup> mice (#002052; Jackson Laboratory) were crossed with male TWEAK<sup>-/-</sup> mice (generously provided by Biogen Idec. Cambridge, Mass) (both on the C57BL/6 background), and the progeny bred back to ApoE<sup>-/-</sup> mice for 7 generations followed by intercrossing to obtain the double knockout (TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) and their littermate control (TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) and TWEAK-heterozygous (TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) mice. Male mice were fed on a standard chow diet during the experiment. To study the effect of TWEAK deletion on early atherosclerotic lesions, TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9), TWEAK<sup>+/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> (N=7) and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9) were sacrificed at 24 weeks of age.

To study the effect of therapeutic anti-TWEAK treatment on established atherosclerotic lesions, 27 TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice (24 weeks of age) were randomized in 3 groups; mice injected i.p. with saline (N=9), anti-TWEAK mAb (10 mg/kg twice a week; N=10) or an irrelevant isotype-matched control IgG specific for Hen egg lysozyme (10 mg/kg twice a week; N=8) during 16 weeks. In addition, TWEAK<sup>+/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> (N=8) and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9) mice were included to analyze the effect of TWEAK deletion on advanced atherosclerotic plaques. A blocking anti-mouse TWEAK mAb (clone P2D10) was generated in TWEAK<sup>-/-</sup> mice [19].

All mice were maintained under barrier conditions. Water and normal laboratory diet was available ad libitum. All mice were sacrificed at 40 weeks of age (Fig. S1). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100mg/kg) and xylazine (15mg/kg). Blood was obtained through retro-orbital puncture. Hearts were perfused with sterile saline via the left ventricle at physiological pressure and aortas were dissected.



Cholesterol was tested in serum samples (Thermo Trance). HDL-c, LDL-c/VLDL-c and triglyceride concentrations were measured in serum with HDL and LDL/VLDL cholesterol assay kit and triglyceride quantification kit, respectively (Abcam).

The housing and care of animals and all the procedures carried out in this study were strictly in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of IIS-Fundación Jiménez Díaz.

### **En face of aorta**

Atherosclerotic lesions were quantified by en face analysis of the whole aorta and by cross-sectional analysis of the aortic root and the innominate artery. For en face preparations, the aorta was opened longitudinally, from the heart to the iliac arteries, while still attached to the heart and major branching arteries in the body. The aorta (from the heart to the iliac bifurcation) was then removed and was “pinned out” on a white wax surface in a dissecting pan using stainless steel pins 0.2 mm in diameter. After overnight fixation with 4% paraformaldehyde and a rinse in PBS, the aortas were immersed for 6 minutes in a filtered solution containing 0.5% Sudan IV, 35% ethanol, and 50% acetone; and destained in 80% ethanol. The Sudan IV–stained aortas were photographed and were used for quantification of atherosclerotic lesions.

### **Aortic root and brachiocephalic artery morphometric analysis.**

Brachiocephalic arteries and hearts containing aortic roots were carefully dissected and frozen in OCT. Aortic roots were sectioned at 5  $\mu$ m thickness beginning proximally at the first evidence of the aortic valves at their attachment site of aorta.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Sections were stained with Oil red O/hematoxylin and hematoxylin at 100  $\mu\text{m}$  intervals from 0 to 1000  $\mu\text{m}$  distal to the site. Maximal lesion area was calculated for each mouse by averaging the values for 3 sections. The individual maximal lesion areas were further averaged to determine the maximal lesion area for each group.

Brachiocephalic arteries were serially sectioned in 5  $\mu\text{m}$  thickness from the aortic root to the right subclavian artery. For morphometric analysis, sections of each brachiocephalic artery were stained with modified Russell-Movat pentachrome (Movat) at 90  $\mu\text{m}$  intervals from 0 to 450  $\mu\text{m}$  distal to the aortic root. The frequency of plaque instability features in each Movat-stained section was evaluated (5 slides per animal, 40-50 slides per group), including the following: thin fibrous cap (defined as <3 cell layers), large necrotic core (defined as occupying >50% of the volume of the plaque), intraplaque hemorrhage (defined as the presence of red blood cells within the plaque and confirmed by TER-119 immunostaining), medial enlargement/erosion (defined as the replacement of the normal media by plaque components), lateral xanthomas (defined as the presence of aggregates of macrophage-derived foam cells situated on the lateral margins of the plaques) and the presence of buried caps (signature of silent plaque rupture). Calcification was analyzed on the basis of positive staining with the von Kossa stain. These parameters were recorded as binary outcomes, and the frequency per lesion for each animal was determined with a maximum possible of 100%.

**Immunohistochemical analysis**

Immunohistochemical analysis was done in all animals included in each group. Picrosirius red staining was performed for analysis of collagen content by measuring birefringence to plane-polarized light. Immunohistochemistry was carried out as

previously described [14]. Primary antibodies were the macrophage marker Mac-3 (M3/84; BD Pharmingen), the foam cell marker adipophilin (GP41; Progen Biotechnik), the smooth muscle cells marker smooth muscle actin (Clone 1A4; Sigma) the chemokines MCP-1 (sc-1785; Santa Cruz Biotechnology) and RANTES (AB2109P, Chemicon), the red blood cell marker TER-119 (sc-19592, Santa Cruz Biotechnology) and the proliferation marker PCNA (sc-7907, Santa Cruz Biotechnology). Apoptosis in the aortic valve region was determined using the TUNEL method as recommended by the manufacturer (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Millipore Ibérica).

Donkey anti-goat biotin, donkey anti-rabbit biotin, goat anti-rat biotin (Amersham) and goat anti-guinea pig biotin (Abcam) were used as secondary antibodies. ABCComplex/HRP was then added and sections were stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAKO), counterstained with hematoxylin, and mounted in Pertex (Medite). Sections were counterstained with Carazzi hematoxylin. Incubation without primary antibodies and/or irrelevant species- and isotype-matched immunoglobulins was used as a negative control for all immunostaining. Computer-assisted morphometric analysis was performed with the Image-Pro Plus software (version 1.0 for Windows). The threshold setting for area measurement was equal for all images. Samples from each animal were examined in a blinded manner. Results were expressed as % positive area versus total area of lipid (Oil red/O), Collagen, MCP-1 and RANTES and as positive cells per square millimeters of lesion of Mac-3, adipophilin, alpha-smooth muscle actin, PCNA and TUNEL.

### **Southwestern histochemistry**

This technique was developed to detect in situ the distribution and DNA-

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

binding activity of transcriptional factors [20]. NF- $\kappa$ B consensus oligonucleotide from the promoter of RANTES was digoxigenin labeled with a 3'-terminal transferase (Roche). OCT-embedded tissue sections were fixed in 0.5% paraformaldehyde and incubated with 0.1 mg/mL DNase I. The DNA binding reaction was performed by incubation with 50 pmol of the labeled DNA probe in buffer containing 0.25% BSA and 1  $\mu$ g/mL poly (dI-dC). The sections were then incubated with alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin Ab, and colorimetric detection was performed as described [20]. Preparations without probe were used as negative controls, and an excess of unlabeled probe was used to test the specificity of the technique. Results are expressed as % positive area vs total area.

**In situ zymography**

To estimate MMP gelatinase activity in situ, we incubated 5- $\mu$ m sections using gelatin conjugated with quenched fluorescein (DQ-gelatin; Invitrogen) as a substrate, which requires cleavage by gelatinolytic enzymes to become fluorescent. DQ-gelatin is a substrate only recognized by two gelatinases, MMP-2 and MMP-9. In brief, DQ-gelatin (1mg/mL in H<sub>2</sub>O) was mixed 1:10 with 1% low-melting agarose (BioWithaker). This mixture (30  $\mu$ L) was added on top of each section, coverslipped, and gelled at 4°C. After 24 h incubation at 37°C, samples were examined under confocal fluorescence microscopy (Leica). Zymographic images were acquired using identical shutter conditions. The mean of fluorescence intensity of each cross section, excluding the media area because of medial elastin filament autofluorescence, was measured. The specificity of gelatinase activity was determined by incubation of DQ-Gelatin in the presence of the broad-spectrum MMP-inhibitors ilomastat (10  $\mu$ mol/L) and phenanthroline (0.5 mmol/L), for 24 hours.

### Protein Array

Soluble plasma concentrations of 20 cytokines were measured using a protein array following the manufacturer's instructions (Quantibody Mouse Cytokine Array 1, RayBiotech, Inc.). Detection of signals was performed through use of a scanner equipped with Cy3 excitation/emission wavelength (555/565 nm) (GenePix Professional 4200A). Microarray analysis software was used to data extraction, as well as for quantitative data analysis.

### RNA extraction and real-time PCR

RNA from total aorta of mice was obtained by TRIzol method (Life Technologies) and quantified by absorbance at 260 nm in duplicate. 2 µg of total RNA was reverse transcribed at 37°C for 50 min in a 20-µl reaction mix containing 200 U Moloney murine leukemia virus (MMLV) RT (Invitrogen), 100 ng of random primers, and 40 U RNase Inhibitor (Invitrogen). Reactions were terminated by heating to 95°C for 5 min, and samples were stored at -70°C. Real-time PCR was performed on a TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System using heat-activated TaqDNA polymerase (Amplitaq Gold). The following PCR primers and TaqMan probes were purchased from Applied Biosystems and optimized according to the manufacturer's protocol: 18S, TWEAK (Mm00839900\_m1), MCP-1 (Mm00441242\_m1) and RANTES (Mm01302428\_m1). After an initial hold of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, the samples were cycled 40 times at 60°C for 15 s and 60°C for 60 s. 18S rRNA served as housekeeping gene and was amplified in parallel with the genes of interest. The expression of target genes was normalized to housekeeping transcripts. The

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

amount of target mRNA in samples was estimated by the 2CT relative quantification method.

**Statistics**

Statistical analysis was performed using SPSS 11.0 statistical software. Data are expressed as mean±SEM. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test. A probability value of 0.05 was considered to be statistically significant.

For Peer Review

## Results

### **TWEAK deficiency reduces atherosclerotic plaque size and increases the plaque collagen/lipid ratio**

To determine the role of TWEAK in atherosclerotic lesions, mice lacking both TWEAK and ApoE (TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>), TWEAK heterozygous (TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) and single knockout controls (TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) were fed with a chow diet and tissue was harvested at 24 and 40 weeks, for study of early and advanced lesions, respectively (Fig. S1). TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice expressed around 40-50 % less aortic TWEAK mRNA than TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice (Fig. S2A). No significant differences were observed in metabolic measures such as body weight or lipid levels between the different groups (Fig. S2).

In early lesions, we found a 44% reduction of the en face aorta lesion area in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice ( $p < 0.05$ ) while a 20% reduction was observed in the TWEAK heterozygous mice (Fig. S3A-B). TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice exhibited significantly reduced plaque size at the aortic root compared with control TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice (45% reduction; mean maximal lesion area;  $p = 0.01$ ), while TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice showed a no significant 37% reduction (Fig. S3C-E). In the advanced lesions, both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice showed significantly reduced en face aorta lesion area (64% and 36% reduction,  $p < 0.001$ ;  $p = 0.015$ ; respectively) and plaque size at the aortic root (41% and 21% reduction,  $p < 0.001$ ;  $p = 0.03$ ; respectively; Fig. 1A-E) as compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> control mice.

Whereas lipid deposits make plaques more prone to rupture, collagen fibers stabilize atherosclerotic plaques [21]. Lipid content was defined as the percentage of

Oil red/O staining area and plaque collagen content was defined as the percentage of Sirius Red area to total plaque area. No significantly changes in lipid or collagen contents were observed in early lesions (not shown). However, in advanced lesions, TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> exhibited reduced lipid content compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (p=0.02; Fig. 1E). Moreover, collagen content was increased in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice (p=0.01; Fig. S4A-B). As a consequence, collagen/lipid ratio was increased in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice compared with control mice (Fig. S4C).

**TWEAK deficiency reduces macrophages and foam cells and increases VSMC content at the aortic root.**

As inflammation has a great impact on the vulnerability of plaques [22], we assessed the degree of inflammation in the aortic root of atherosclerotic mice. In early lesions, TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> showed a 53% diminution in the content of macrophages (Mac-3) and 34% in foam cells (Adipophilin) compared with control mice (p=0.004 and p<0.001; respectively) (Fig. S5). Both parameters were also found decreased in heterozygous mice as compared to controls, but only foam cells change was statistically significant (p=0.005). In addition, TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> showed a 82% increment in VSMC content compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice (p=0.01) (Fig. S5). Similarly, in advanced atherosclerotic lesions TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice showed a 46% reduction in the content of macrophages and 32% in foam cells as compared to controls (p<0.001 for both types of cells; Fig. 2A). Only macrophage content was diminished in heterozygous mice (p=0.02). TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice exhibit a 79% increment in VSMC content compared to control mice (p=0.01; Fig. 2). As a consequence, the VSMC/macrophage ratio was increased in the lesions of TWEAK<sup>-/-</sup>



ApoE<sup>-/-</sup> mice, thus indicating a change to a more stable phenotype in advanced atherosclerotic lesions.

Changes in cellular composition observed in double knockout mice were not related with changes in plaque cellularity. The total number of cells was not changed in the different groups included in our study (Fig. S6). In addition, no changes in the amount of PCNA or TUNEL positive cells were observed between the different groups analyzed (Fig. S6).

To determine the mechanisms by which TWEAK deletion results in reduced macrophage content, we evaluated the expression of inflammatory chemokines that have a prominent role in the proinflammatory response associated with atherosclerotic plaque progression [23-24]. MCP-1 and RANTES participate in the recruitment of monocytes/macrophages in atherosclerotic plaques [24] and their expression is controlled by the transcription factor nuclear factor kappa B (NF-κB) [25]. Early lesions from TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice exhibited a diminished mRNA and protein expression of both chemokines and attenuated NF-κB activity when compared with their littermate controls (Fig. S7). The anti-inflammatory effect of TWEAK deficiency was more evident in advanced lesions with MCP-1 and RANTES mRNA and protein expression and NF-κB activation strongly diminished in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice relative to controls (Fig. 3). To confirm changes in the proinflammatory profile, protein array of 20 cytokines from plasma of the different animal groups were done. Both MCP-1 and RANTES along with KC, GM-CSF and IL-13 concentrations were diminished in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> compared to TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4).

### **3.3. Therapeutic Anti-TWEAK mAb treatment reduced lesion size and increased plaque stability at the aortic root.**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

We further studied whether long therapeutic anti-TWEAK treatment would protect against plaque progression from the early to the advanced stage. 24 week-old TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice were treated with either anti-TWEAK mAb or control IgG (10 mg/kg/twice a week for both) during 16 weeks (Fig. S1). No significant differences were observed in metabolic measures such as body weight or lipid levels between the different groups (Fig. S2). Anti-TWEAK treated mice exhibited diminished en face aorta lesion area and plaque size compared with either of the 40 week-old control groups, the control IgG-treated mice (p=0.007, p=0.04; respectively) and the TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (p=0.002, p=0.003; respectively) (Fig. 1). Anti-TWEAK treated mice showed a diminution in lipid content at the aortic root compared with control mice (p=0.02 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and p<0.001 vs IgG treated mice; Figure 1E). Although anti-TWEAK therapy augmented collagen content in TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> as compared with administration of control IgG, no statistically differences were observed. Collagen/lipid ratio was clearly increased in anti-TWEAK treated TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> compared with control mice (p=0.03), indicating that therapeutic anti-TWEAK treatment increased plaque stability.

Anti-TWEAK treatment increased VSMC content (p<0.001) and reduced both macrophages and foam cells (p<0.001 for Mac-3; p=0.001 for Adipophilin) in aortic root lesions (Fig. 2). VSMC/Macrophage ratio was also increased in anti-TWEAK treated mice (Fig. 2C). MCP-1 and RANTES mRNA, protein expression and plasma concentrations (p<0.001 for all) and NF-κB activation (p=0.01) were also diminished in anti-TWEAK treated mice relative to control mice (Fig. 3). All together, these data indicate that anti-TWEAK treatment diminished the inflammatory response and increased features of plaque stability in TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice.

**TWEAK deficiency or therapeutic anti-TWEAK treatment improve features of brachiocephalic artery atherosclerotic plaque instability.**

The potential stabilizing effect of either TWEAK deletion or anti-TWEAK treatment was tested in brachiocephalic artery, in which advanced plaque presents similar phenotypic features observed in unstable human lesions [18, 26], and some of these features are more evident than in the lesion of aortic root. As atherosclerotic lesions of brachiocephalic arteries from 24 week-old mice represent an early step in atherosclerotic plaque development (mainly fatty streaks) [27], we therefore studied 40 week-old mice.

Atherosclerotic plaque size and luminal occlusion in brachiocephalic artery were reduced in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> controls (Fig. 5A-B). Mice treated with anti-TWEAK also showed a diminished plaque size and lumen occlusion at 40 weeks of age as compared with either TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or control IgG-treated animals (Fig. 5A-B).

TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and anti-TWEAK treated mice showed reduced lipid content compared with their respective control groups (Fig. 5A-C). Likewise, TWEAK deficiency and anti-TWEAK treatment also increased collagen content in brachiocephalic artery, although no statistically differences were observed (Fig. 5A-C). The collagen/lipid ratio of either TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice was more than twice as high as in control groups (not shown). Although VSMC were increased in both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice, no statistically differences were observed (Fig. 6A-B). Macrophage content was diminished in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK-treated mice compared with control animals ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6A-B). As a consequence, VSMC/Macrophage ratio was increased in both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and anti-TWEAK treated mice (Fig. 6C), indicating an

increment in the stability of these atherosclerotic lesions.

Plaques were also analyzed at the brachiocephalic artery for other features that both associate with and contribute to plaque instability such as the presence of lateral xanthomas, buried caps, necrotic core, thin fibrous cap, medial erosion, intraplaque hemorrhage and calcium content [18]. Both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and anti-TWEAK-treated mice exhibited a reduced frequency of lateral xanthomas, medial erosion and presence of buried caps compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (Fig. 7A-B).

It has been suggested that intraplaque hemorrhage occur predominantly within the lateral xanthoma and is consistent with similar plaque rupture along the lateral margins in humans [18]. The presence of intraplaque hemorrhage was diminished in both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and anti-TWEAK treated mice compared with control animals (Fig. 7A-B). The presence of intraplaque hemorrhage was confirmed by TER-119 immunostaining, a marker of red blood cells (Fig. S8).

VSMC can be converted to osteogenic (chondrocyte-like) cells in vitro suggesting that they play a role in vascular calcification in vivo [28], a marker of plaque vulnerability in humans [29]. The presence of chondrocyte-like cells was diminished in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (Fig. S9). However, chondrocyte-like cells were non-significantly reduced in anti-TWEAK treated mice. However, both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and anti-TWEAK-treated mice exhibited a reduction in calcium content (Von Kossa staining) compared with controls (Fig. S9). Collectively, these results demonstrate that both TWEAK deficiency and anti-TWEAK treatment reduced several features of an unstable plaque phenotype.

**TWEAK deletion or anti-TWEAK treatment diminished gelatinolytic activity in advanced atherosclerotic lesions.**

Besides plaque composition, metalloproteinases (MMP) activity is thought to have a great impact on plaque stability [30]. In situ zymography with quenched fluorescein-labeled gelatin in the atherosclerotic plaques present at the aortic root or brachiocephalic arteries showed reduced mean fluorescence intensity in TWEAK<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> compared with TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> (Fig. S10, Fig. 8, respectively). Anti-TWEAK therapy also reduced mean fluorescence intensity compared with either TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> or IgG treated mice. Pretreatment with two inhibitors of MMP activity, 0.5 mmol/L phenanthroline and 10 µmol/L ilomastat, or agarose gel lacking fluorescein-labeled gelatin substantially reduced fluorescence signal detected via 480-nm channel (Fig. 8). Taken together, these data provide evidence that TWEAK plays a role in vascular remodelling associated with atherosclerotic plaque instability.

4. Discussion

Development, progression and ultimate rupture of an atherosclerotic plaque involve complex pathological mechanisms. Identification of underlying causes and successful medical treatment remains a major challenge in modern vascular medicine. Our results demonstrated that TWEAK participates in atherosclerotic plaque development, progression, and instability. TWEAK deletion or blockade diminished atherosclerotic lesion size in both aortic root and brachiocephalic arteries of ApoE KO mice. VSMC cells were increased and macrophages and foam cells and gelatinolytic activity were reduced in atherosclerotic lesions of TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice, effect associated with a diminution in the proinflammatory response. We provides evidence that TWEAK deletion or blockade promotes multiple features of atherosclerotic plaque stability in brachiocephalic arteries, including a diminution in the presence of lateral xanthomas, buried caps, medial erosion, calcium content and intraplaque hemorrhage. Our results suggest that TWEAK blockade plays a dual atheroprotective role in advanced atherosclerotic plaques by promoting anti-inflammatory effects and enhancing features of plaque stability.

In agreement with previous studies in which TWEAK injection increased and treatment with Fn14-Fc fusion protein diminished atherosclerotic lesion size in aortic root of ApoE KO mice [15], our results demonstrate that TWEAK deletion or blockade decreased atherosclerotic lesion size in mice. However, clinically, lesion composition rather than size or degree of stenosis of the lesion determine the likelihood of plaque rupture and subsequent thrombotic complications [2]. Unstable plaques are rich in inflammatory cells and exhibit a substantial loss of VSMC and collagen content [31-32]. TWEAK deletion or anti-TWEAK treatment induce a change in cellular composition in atherosclerotic plaques. The presence of VSMC was

increased and macrophages infiltration was diminished in atherosclerotic lesions in the aortic root. The underlying mechanism of the reduction in macrophage content by TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy is most likely related to the reduction in chemokine expression. TWEAK increases the expression of several proinflammatory cytokines in cultured VSMC and macrophages, including MCP-1, IL-8, IL-6 and RANTES [9, 33]. These cytokines are controlled by the transcription factor NF- $\kappa$ B [25]. We show that prolonged inhibition of TWEAK signalling was able to maintain the diminution of chemokines expression and NF- $\kappa$ B activation, suggesting a chronic effect of TWEAK inhibition on inflammatory response observed in atherosclerotic lesions.

Lesional macrophages are a major source of MMP expression. We demonstrate herein a diminution in gelatinolytic activity in established atherosclerotic lesions from both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice. The proteolytic activity should be related with MMP-9 activity, since TWEAK increases MMP-9 but not MMP-2 activity in cultured macrophages [33]. The mechanisms by which TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy reduce MMP-9 activity might be attributed to a diminution in macrophages content but also to a reduction in NF $\kappa$ B activity since this transcription factor is implicated in the regulation of MMP-9 [34].

Degradation of collagen by MMPs has been demonstrated in human atherosclerotic lesions prone to rupture [34]. Most likely as a direct consequence of the reduced infiltration or activation of MMP-secreting macrophages, the collagen content was ~ 25% higher in advanced plaques of TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> than TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice. TWEAK deletion or anti-TWEAK treatment was capable of decelerating atheroprogession, strongly reducing lipid deposits ~ 50% in advanced atherosclerotic plaques present in ApoE KO mice. This diminution is likely related to

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

the reduction observed in both macrophages and foam cells, but could also be due to TWEAK's role in promoting lipid uptake by macrophages [15].

In order to further advance our understanding of the role of TWEAK in atherosclerotic plaque instability, we have analyzed plaque present in brachiocephalic artery of ApoE KO mice since phenotypic features of human plaque instability are more evident in unstable brachiocephalic atherosclerotic lesions than in aortic root [17]. VSMC/macrophages and collagen/lipid ratio were increased and gelatinolytic activity was diminished in mice lacking TWEAK or treated with anti-TWEAK.

Moreover, TWEAK deletion or anti-TWEAK treatment reduces the presence of lateral xanthomas, aggregates of macrophage derived foam cells, that form fatty streaks along the margins of the established plaques [27], as well as buried caps, which may be the signature of silent plaque rupture. Formation of lateral fatty streaks will give rise to secondary lesions that layer on top of the established plaques, being one way by which the overall advanced plaque progresses [18]. The disruption of these lateral xanthomas leads to intraplaque hemorrhage [18]. In our study, 40 week-old ApoE KO mice present a high frequency of intraplaque hemorrhage ( $\approx 80\%$ ). This result is in agreement with data reported by Rosenfeld et al. who observed that up to 75 % of ApoE KO mice aged 30 to 60 weeks exhibit intraplaque hemorrhage [18]. TWEAK deletion or anti-TWEAK treatment reduced the presence of intraplaque hemorrhage in ApoE KO mice. Increased presence of red blood cells within plaques is associated with an unstable plaque phenotype in humans and may directly contribute to plaque instability owing to the high cholesterol content of red blood cells [35].

Another characteristic of unstable atherosclerotic plaques is the presence of large necrotic cores and thin fibrous caps that are predisposed to rupture [32]. The



frequency of necrotic core and thin fibrous cap in brachiocephalic arteries were diminished in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice compared with TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or IgG treated mice though these differences did not achieve statistical significance. This could be due to the fact that in control mice the plaques with large necrotic cores progress, converting to highly fibrotic nodules. These nodules are highly cellular and most of these cells express markers of chondrocyte and osteoblast phenotype [36]. This conversion from a plaque with a large necrotic zone to a fibrotic nodule is accompanied by conversion of resident VSMC to chondrocyte-like cells [28]. Consistent with this notion, the chondrocyte-like cells were reduced in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and calcium content was diminished in both the TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and anti-TWEAK treated mice. The formation of the fibrotic nodules is accompanied by the invasion of the medial layer by plaque leading to a thickening of the media (medial erosion) [27]. We observed that the frequency of medial erosion was also reduced in both TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> or anti-TWEAK treated mice. Overall, these data indicate that TWEAK deletion or blockade delay atheroprogession and increase plaque stability in ApoE KO mice.

In conclusion, our results not only support the notion that TWEAK plays a substantial role in atherosclerosis plaque formation and instability but also that blocking TWEAK-mediated pathway would be a new target for prevention and treatment of atherosclerosis. Blockade of TWEAK can recapitulate the genetic phenotype obtained in TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> preventing atherosclerotic complications by reduction of inflammatory response and associated macrophage recruitment and increasing plaque stability through an MMP-dependent mechanism.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Acknowledgments**

This study was supported by FIS (Programa Estabilización Investigadores to LB-C, Miguel Servet to JAM), Instituto de Salud Carlos III (RETICS RD12/0042/0038; PI10/00234; PI10/00072), Sociedad Española de Arteriosclerosis, Fundación Mútua Madrileña and a research grant from Biogen Idec (to LB-C).

**Conflict of interest**

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

## References

1. **Libby P.** Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. *Am. J. Cardiol.* 2006;98:3Q–9Q.
2. **Libby P, Theroux P.** Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111:3481–3488.
3. **Swirski FK, Nahrendorf M, Libby P.** The ins and outs of inflammatory cells in atheromata. *Cell Metab.* 2012;15:135–136.
4. **Mallat Z, Tedgui A.** Cytokines as regulators of atherosclerosis in murine models. *Curr Drug Targets.* 2007;8:1264–1272.
5. **Inoue S, Egashira K, Ni W, et al.** Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2002;106:2700–2706.
6. **Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al.** Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ. Res.* 2001;89:E41–5.
7. **Koga M, Kai H, Yasukawa H, et al.** Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. *Circ Res.* 2007;101:348–356.
8. **Winkles JA.** The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:411–425.
9. **Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Martínez E, et al.** Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke*. 2006;37:2044–2053.

10. **Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Munoz-Garcia B, et al.** Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:916–922.

11. **Harada N, Nakayama M, Nakano H, et al.** Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299:488–493.

12. **Lynch CN, Wang YC, Lund JK, et al.** TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:8455–8459.

13. **Munoz-Garcia B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, et al.** TWEAK-Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2011;89:225–233.

14. **Munoz-Garcia B, Moreno JA, Lopez-Franco O, et al.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2061–2068.

15. **Schapira K, Burkly LC, Zheng TS, et al.** Fn14-Fc Fusion Protein Regulates Atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> Mice and Inhibits Macrophage Lipid Uptake In Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2021–2027.

16. **Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, et al.** Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*. 2001;103:934–940.
17. **Johnson J, Carson K, Williams H, et al.** Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment. *Circulation*. 2005;111:1422–1430.
18. **Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, et al.** Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2587–2592.
19. **Campbell S, Burkly LC, Gao HX, et al.** Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells. *J Immunol*. 2006;176:1889–1898.
20. **Hernández-Presa MA, Gómez-Guerrero C, Egido J.** In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int*. 1999;55:209–214.
21. **Rekhter MD.** How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? *Cardiovasc Res*. 2002;54:36–41.
22. **Stoll G, Bendszus M.** Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;37:1923–1932.
23. **Weber C, Noels H.** Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410–1422.
24. **Zernecke A, Weber C.** Chemokines in the vascular inflammatory response of

atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2010;86:192–201.

25. **de Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, et al.** Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:904–914.

26. **Williams H, Johnson JL, Carson KGS, et al.** Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:788–792.

27. **Rosenfeld ME, Averill MM, Bennett BJ, et al.** Progression and disruption of advanced atherosclerotic plaques in murine models. *Curr Drug Targets.* 2008;9:210–216.

28. **Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al.** Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 2001;89:1147–1154.

29. **Alexopoulos N, Raggi P.** Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:681–688.

30. **Newby AC.** Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2108–2114.

31. **Davies MJ.** The composition of coronary-artery plaques. *N Engl J Med.* 1997;336:1312–1314.

32. **Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al.** Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions.

- 1  
2  
3 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1262–1275.
- 4  
5  
6 33. **Kim SH, Kang YJ, Kim WJ, et al.** TWEAK can induce pro-inflammatory  
7 cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J.* 2004;68:396–  
8 399.  
9  
10  
11  
12  
13  
14 34. **Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al.** Human monocyte-derived macrophages  
15 induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential  
16 role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.  
17 *Circulation.* 1995;92:1565–1569.  
18  
19  
20  
21  
22  
23 35. **Michel JB, Virmani R, Arbustini E, et al.** Intraplaque haemorrhages as the  
24 trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J.* 2011;32:1977–85, 1985a, 1985b,  
25 1985c.  
26  
27  
28  
29  
30  
31 36. **Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, et al.** Calcification of advanced atherosclerotic  
32 lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of  
33 chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1420–1425.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure Legends

**Figure 1.- TWEAK deletion or anti-TWEAK mAb therapy reduced vascular damage in 40 week-old ApoE KO mice.**

- A) Representative pinned-out en face aorta preparations and B) quantification of atherosclerosis from 40 week-old mice stained with Sudan-IV. \*  $p<0.01$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p=0.01$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p=0.007$  vs control IgG.
- C) Representative Oil-Red-O/Hematoxylin staining and D) quantification of lesion area along the aortic root in 40 week-old mice. Scale bar, 200  $\mu$ m.
- E) Average of maximal lesions per group and quantification of Oil-Red-O staining in the aortic root of mice. Values shown are mean $\pm$ SEM in all animals included in each group \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.05$  vs control IgG.

**Figure 2.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy diminished macrophage content in advanced atherosclerotic plaques of ApoE KO mice.**

- A) Representative immunostaining and B) quantification of  $\alpha$ -SMA, Mac-3 and Adipophilin in aortic lesions from 40 week-old ApoE KO mice. Values shown are mean $\pm$ SEM in all animals included in each group. \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.05$  vs control IgG.
- Scale bar, 50  $\mu$ m.
- C) Plaque stability was assessed by forming  $\alpha$ -SMA to Mac-3 ratio. Values shown are mean $\pm$ SEM. \*  $p<0.005$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.001$  vs control IgG.



**Figure 3.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy reduced pro-inflammatory chemokine expression and NF- $\kappa$ B activation in advanced atherosclerotic plaques of ApoE KO mice.**

- A) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis on MCP-1 and RANTES mRNA expression in total aorta of 40 week-old mice. Values shown are mean $\pm$ SEM. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.005$  vs control IgG.
- B) Representative immunostaining and C) quantification of RANTES, MCP-1 and NF- $\kappa$ B in aortic lesions from 40 week-old ApoE KO mice. Values shown are mean $\pm$ SEM of all animals included in each group. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.005$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.005$  vs control IgG. Scale bar, 50  $\mu$ m.

**Figure 4.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy reduced cytokine plasma concentrations in ApoE KO mice.**

- A) Representative cytokine array of plasma from 40 week-old mice. Slides were scanned using a GenePix 4000A microarray scanner and image analysis was performed with GenePix Pro software (version 6.0).
- (B) Quantification of cytokines in plasma from 40-week-old mice. Values shown are mean $\pm$ SEM (N=8 per group). \* $p < 0.05$  vs controls. GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulation factor; INF- $\gamma$ : Interferon gamma; IL: Interleukins; KC: keratinocyte-derived chemokine; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1; RANTES: regulated and normal T cell expressed and secreted; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 5.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy diminished atherosclerotic lesion size and % luminal occlusion in the brachiocephalic artery of ApoE KO mice**

- A) Representative photographs of Movat's pentachrome sections, Sirius red–stained (collagen) and oil red O–stained (lipids) sections of the brachiocephalic artery from different groups. Scale bar, 200  $\mu$ m.
- B) Average of maximal lesion area per group and percentage of luminal occlusion in the brachiocephalic artery. Values shown are mean $\pm$ SEM in all animals included in each group. \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.01$  vs control IgG.
- C) Quantification of Sirius red and Oil red/O staining. Mean areas of lipid deposition and collagen content of all mice of one group are shown with SEM. \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.05$  vs control IgG.

**Figure 6.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy diminished macrophage and increased VSMC content in brachiocephalic artery of ApoE KO mice.**

- A) Representative immunostaining and B) quantification of  $\alpha$ -SMA and Mac-3 in brachiocephalic lesions from 40 week-old ApoE KO mice. Values shown are mean $\pm$ SEM in all animals included in each group. \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p=0.001$  vs control IgG. White scale bar, 200  $\mu$ m; Black scale bar, 50  $\mu$ m.
- C) Plaque stability was assessed by forming  $\alpha$ -SMA to Mac-3 ratio. Values shown are mean $\pm$ SEM. \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.05$  vs control IgG.

**Figure 7.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy increased plaque stability in brachiocephalic artery of ApoE KO mice.**

- A) Representative photographs of Movat's pentachrome stained sections of the

brachiocephalic artery of mice showing the presence of lateral xanthomas, buried fibrous caps, medial erosion, intraplaque hemorrhage, chondrocyte-like cells, necrotic core and thin fibrous cap. Scale bar, 50  $\mu$ m.

B) Frequency of morphologic markers of plaque instability in the innominate artery of ApoE KO mice. Values shown are the means $\pm$ SEM of all animals included in each group. \*  $p<0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p<0.05$  vs control IgG.

**Figure 8.- TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy reduced gelatinase activity in brachiocephalic artery of ApoE KO mice.**

A) Representative fluorescence photographs and B) mean fluorescence intensity in the atherosclerotic lesions presents in the brachiocephalic artery assayed for in situ gelatinase activity. Values shown are mean $\pm$ SEM of all animals included in each group. \*  $p<0.01$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p=0.02$  vs control IgG. Scale bar, 200  $\mu$ m.

Supporting Information

Fig. S1: Schematic representation of the animal model.

To study the effect of TWEAK deletion in early or advanced atherosclerotic lesions, TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice consumed a chow diet were sacrificed at 24 or 40 weeks, respectively. To test the effect of therapeutic TWEAK blockade on already established atheroma, 24 week-old TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice were treated with anti-TWEAK or control IgG (10 mg/kg/twice a week for both) during 16 weeks.

Fig. S2: TWEAK deficiency or anti-TWEAK therapy do not significantly alter metabolic parameters.

(A) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis on TWEAK mRNA expression in total aorta of 24 and 40 week-old TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice. Values shown are mean±SEM.

Body weight (B) and plasma levels of cholesterol, LDL/VLDL, HDL and triglycerides (C) were quantified from TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> at 24 weeks of age. In addition, body weight (B) and lipid plasma levels (D) were quantified from TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> treated with anti-TWEAK mAb or control IgG at 40 weeks of age. Data represents mean±SEM of all animals included in each group.

Fig. S3.- TWEAK deletion decreased vascular damage in 24 week-old ApoE KO mice.

A) Representative pinned-out en face aorta and B) Quantification of atherosclerosis for male 24 week-old mice in en face aorta. \* p=0.005 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

C) Representative Oil-Red-O/Hematoxylin staining and D) quantification of lesion area along the aortic root in 24 week-old mice. Scale bar, 200 μm.

E) Average of maximal lesions per group. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

**Fig. S4: TWEAK deletion diminished macrophage and foam cells and increased VSMC content in early atherosclerotic plaques from ApoE KO mice.**

A) Representative immunostaining and B) quantification of positive staining of  $\alpha$ -SMA, Mac-3 and Adipophilin in the aortic root of 24 week-old TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9), TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=7) and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9) mice. Values shown are mean $\pm$ SEM. \*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

**Fig. S5.- TWEAK deletion increased collagen content in the aortic root of 40 week-old ApoE KO mice.**

A) Representative staining and B) quantification of Sirius red in the aortic root of 40 week-old mice. Values shown are mean $\pm$ SEM of all animals included in each group.

\*  $p < 0.05$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>. Scale bar, 200  $\mu$ m.

C) Plaque stability was assessed by the collagen to lipid ratio. \*  $p = 0.001$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p = 0.009$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  $p < 0.001$  vs control IgG.

**Fig. S6: TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy did not modify proliferation or apoptosis in advanced atherosclerotic plaques of ApoE KO mice.**

A-B) Representative staining of PCNA and TUNEL in aortic lesions from 40 week-old ApoE KO mice. Scale bar, 50  $\mu$ m.

C) Quantification of PCNA or TUNEL positive cells as well as total number of cells per square millimeters of lesion in the aortic root of ApoE KO mice. Values shown are mean $\pm$ SEM of all animals included in each group. PCNA negative control: tissue incubated with non-specific IgG. TUNEL negative control: Tissue incubated without enzyme (-TdT). TUNEL positive control: tissue treated with DNase before add TdT enzyme (DNase + TdT).

**Fig. S7: TWEAK deletion diminished pro-inflammatory chemokine expression and NF-κB activation in early atherosclerotic plaques of ApoE KO mice.**

A) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis on MCP-1 and RANTES mRNA expression in total aorta of 24 week-old TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice. Values shown are mean±SEM. \* p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; # p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.

B) Representative staining and C) quantification of positive staining of MCP-1, RANTES and NF-κB in the aortic root of 24 week-old TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9), TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=7), and TWEAK<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> (N=9) mice. Values shown are mean±SEM. \* p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; # p<0.05 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>. Scale bar, 50 μm.

**Fig. S8: Presence of erythrocytes in the atherosclerotic lesions present in the brachiocephalic artery of ApoE KO mice.**

Representative immunostaining of TER-119 in brachiocephalic artery from 40 week-old ApoE KO mice. Scale bar, 50 μm.

**Fig. S9: TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy diminished lesion calcification in brachiocephalic artery of ApoE KO mice.**

A) Representative statining and B) quantification of Von Kossa staining in the atherosclerotic lesion present in the innominate artery of ApoE KO mice. Values shown are mean±SEM of all animals included in each group. \* p<0.01 vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; † p<0.001 vs control IgG. Scale bar, 200 μm.

**Fig. S10: TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy reduced gelatinase activity in advanced atherosclerotic lesions of ApoE KO mice.**

A) Representative fluorescence photographs of aortic root assayed for in situ gelatinase activity using DQ-gelatin. Scale bar, 100 μm.

1  
2  
3 B) Quantification of mean fluorescence intensity in the atherosclerotic lesions  
4  
5 presents in the aortic root. Values shown are mean $\pm$ SEM of all animals included in  
6  
7 each group. \*  $p<0.001$  vs TWEAK<sup>+/+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; #  $p<0.001$  vs TWEAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>; †  
8  
9  $p=0.01$  vs control IgG.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

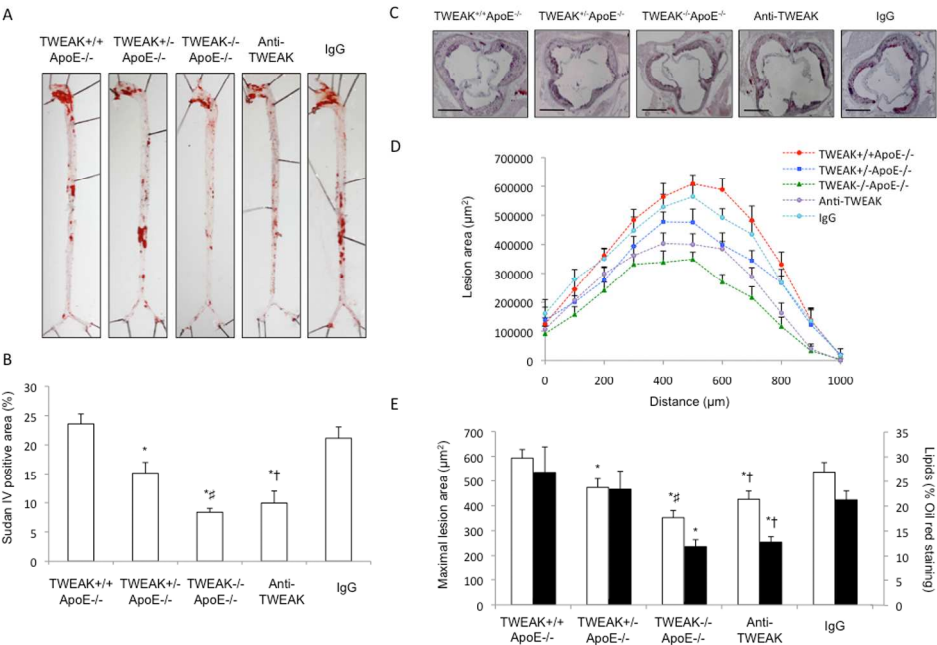


Figure 1

382x264mm (300 x 300 DPI)



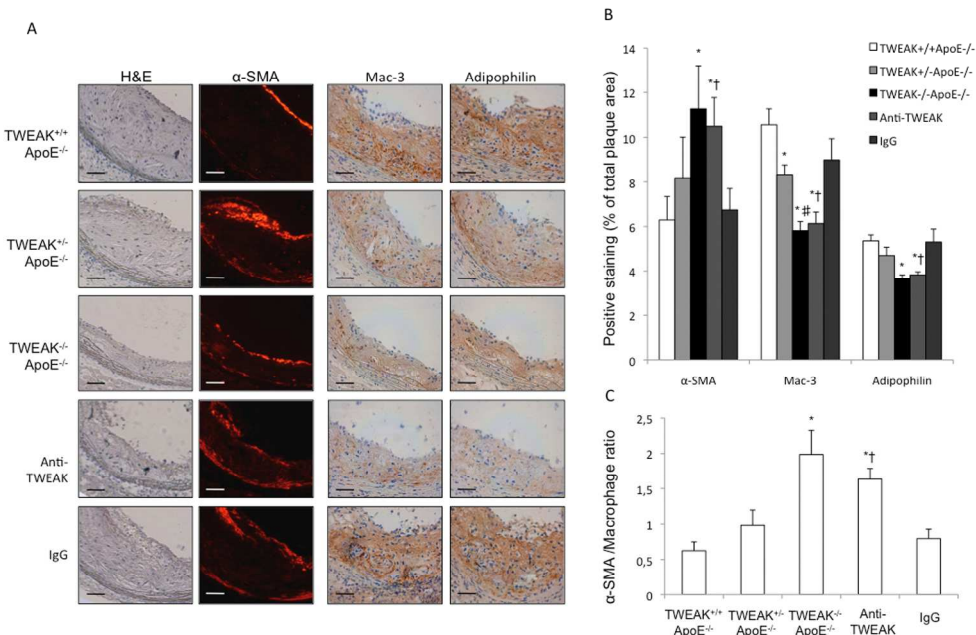


Figure 2

382x264mm (300 x 300 DPI)

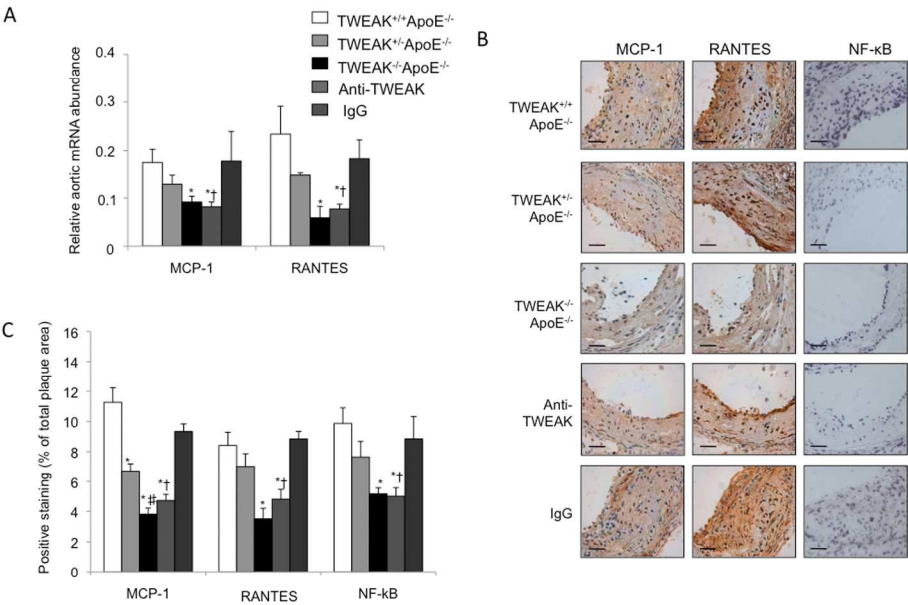


Figure 3

382x264mm (300 x 300 DPI)

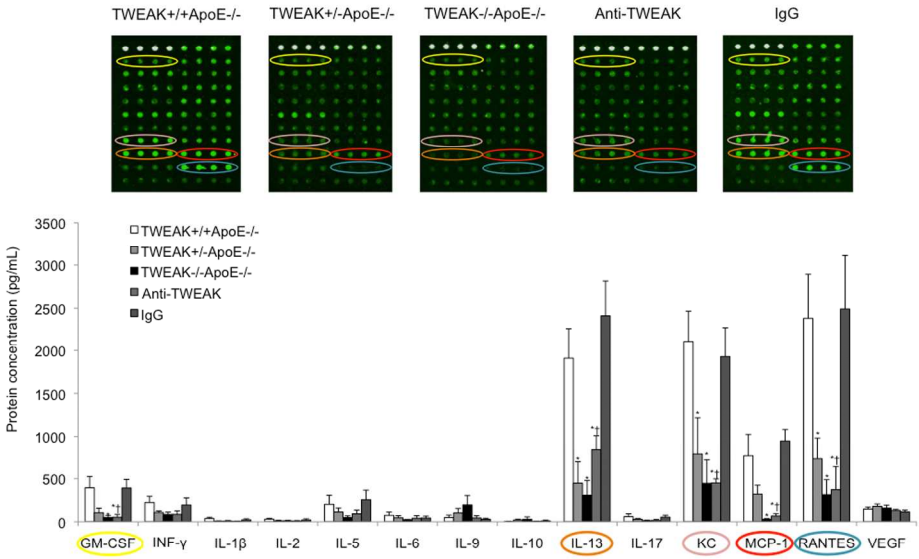


Figure 4

382x264mm (300 x 300 DPI)

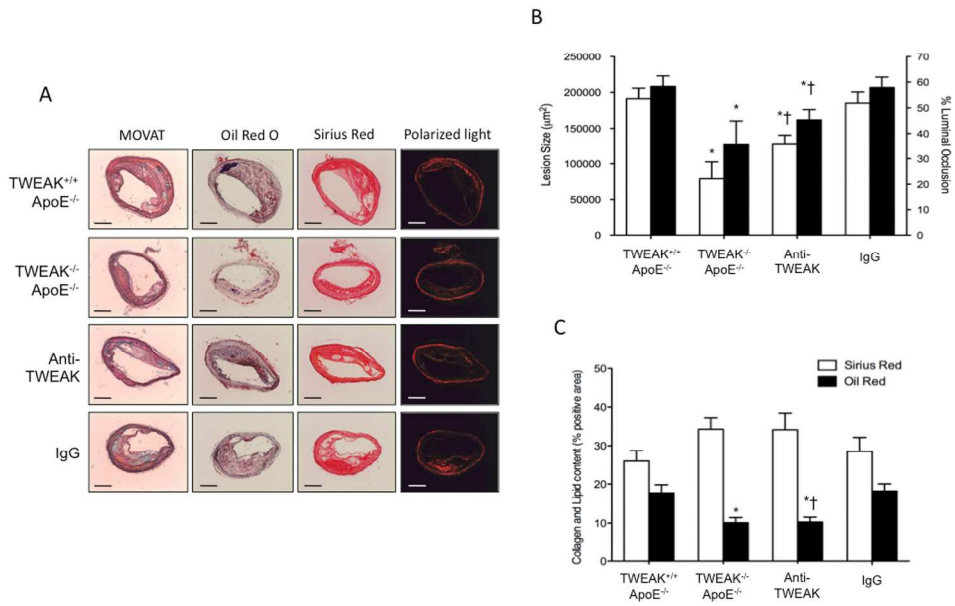


Figure 5

382x264mm (300 x 300 DPI)

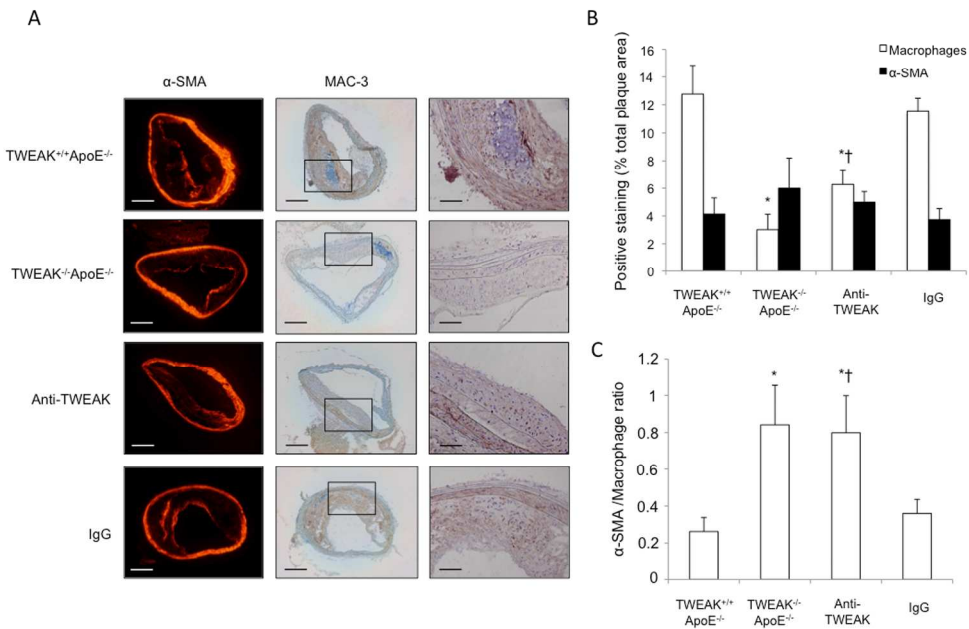


Figure 6

382x264mm (300 x 300 DPI)

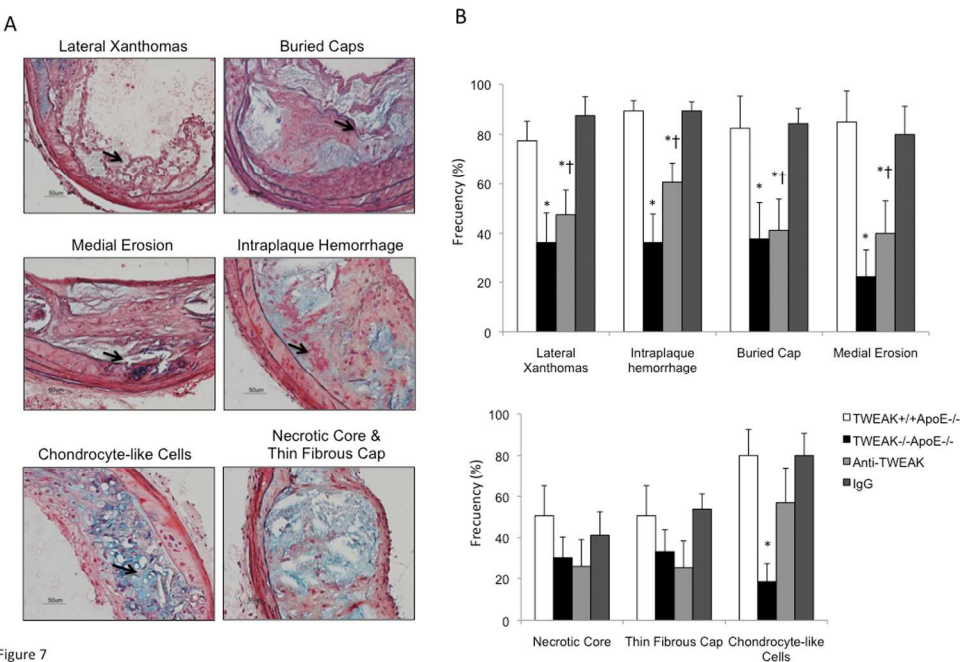


Figure 7

382x264mm (300 x 300 DPI)

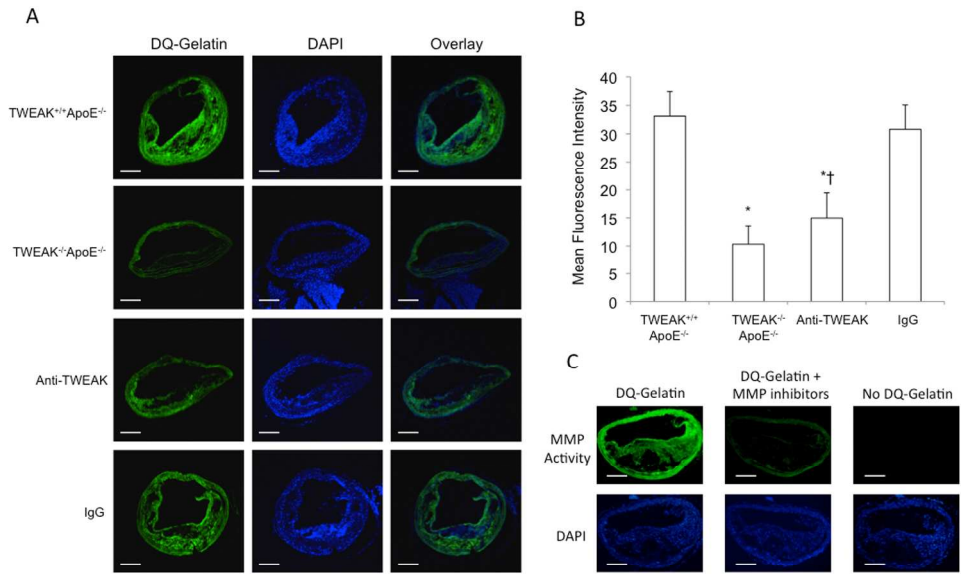


Figure 8

382x264mm (300 x 300 DPI)

# Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

## **HMGB1 Expression and Secretion Are Increased Via TWEAK–Fn14 Interaction in Atherosclerotic Plaques and Cultured Monocytes**

Juan A. Moreno, Cristina Sastre, Julio Madrigal-Matute, Begoña Muñoz-García, Luis Ortega, Linda C. Burkly, Jesús Egido, Jose L. Martín-Ventura and Luis M. Blanco-Colio

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:612-620; originally published online January 3, 2013;  
doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300874

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is published by the American Heart Association, 7272  
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2013 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the  
World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/33/3/612>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2013/01/03/ATVBAHA.112.300874.DC1.html>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:

<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>



## HMGB1 Expression and Secretion Are Increased Via TWEAK–Fn14 Interaction in Atherosclerotic Plaques and Cultured Monocytes

Juan A. Moreno, Cristina Sastre, Julio Madrigal-Matute, Begoña Muñoz-García, Luis Ortega, Linda C. Burkly, Jesús Egido, Jose L. Martín-Ventura, Luis M. Blanco-Colio

**Objective**—High-mobility group box 1 (HMGB1), a DNA-binding cytokine expressed mainly by macrophages, contributes to lesion progression and chronic inflammation within atherosclerotic plaque. It has been suggested that different cytokines could regulate HMGB1 expression in monocytes. We have analyzed the effect of tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (TWEAK) on HMGB1 expression both in vivo and in vitro.

**Methods and Results**—Expression of TWEAK and its receptor fibroblast growth factor–inducible 14 (Fn14) was positively correlated with HMGB1 in human carotid atherosclerotic plaques. TWEAK increased HMGB1 mRNA expression and protein secretion in human acute monocytic leukemia cell line cultured monocytes. TWEAK-mediated HMGB1 increase was only observed in M1 macrophages but not in M2 ones. These effects were reversed using blocking anti-Fn14 antibody or nuclear factor-kappa B and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors. TWEAK also increased monocyte chemoattractant protein-1 secretion in human acute monocytic leukemia cell line cells, an effect blocked with an HMGB1 small interfering RNA. Systemic TWEAK injection in ApoE<sup>−/−</sup> mice increased HMGB1 protein expression in the aortic root and mRNA expression in total aorta of ApoE<sup>−/−</sup> mice. Conversely, TWEAK-blocking antibodies diminished HMGB1 protein and mRNA expression compared with IgG-treated mice.

**Conclusion**—Our results indicate that TWEAK can regulate expression and secretion of HMGB1 in monocytes/macrophages, participating in the inflammatory response associated with atherosclerotic plaque development. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:612–620.)

**Key Words:** atherosclerosis and monocytes ■ Fn14 ■ HMGB1 ■ TWEAK

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by accumulation of atherogenic lipoproteins, extracellular matrix, vascular smooth muscle cells (VSMCs), and inflammatory cells. It is known that cytokines within atherosclerotic plaques play an important role in the progression of atherosclerosis.<sup>1,2</sup> Tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a recently described member of the tumor necrosis factor superfamily, which is initially synthesized as a type II membrane-bound protein and is processed quickly into a smaller, soluble fragment, which mediates the different biological properties of this molecule.<sup>3</sup> Interaction of TWEAK with its receptor, the fibroblast growth factor–inducible 14 (Fn14), induces a high number of physiological and pathological processes depending on cell type and environment.<sup>4</sup> TWEAK is expressed at high levels in intestine, pancreas, heart, lung, brain, ovary, vasculature, and skeletal muscle, and at lower levels in liver and kidney.<sup>3,4</sup> In contrast, Fn14 is expressed at low levels or is absent in healthy tissues. Within the vasculature, TWEAK

is expressed in normal nonatherosclerotic arteries, while its receptor is absent.<sup>5,6</sup> However, both TWEAK and Fn14 are expressed in different areas of human atherosclerotic plaques colocalizing with VSMCs and macrophages.<sup>5</sup> TWEAK–Fn14 interaction is implicated in several processes associated with atherosclerotic plaque development, such as inflammation,<sup>7</sup> proliferation and migration of vascular cells,<sup>8</sup> thrombosis,<sup>9</sup> and angiogenesis.<sup>8,9</sup> In this context, it has been demonstrated that TWEAK enhances vascular lesions associated with hyperlipidemia in apolipoprotein E (ApoE) knockout mice by exacerbating secretion of proinflammatory cytokines favoring macrophage recruitment.<sup>10</sup> These data indicate that Fn14–TWEAK interaction takes place in the diseased vessel wall, which may have adverse outcomes in atherosclerotic lesion progression.<sup>10–12</sup>

On the other hand, high-mobility group box 1 (HMGB1) is a highly conserved and ubiquitous protein mostly expressed in the nuclei of cells. HMGB1 is released from necrotic cells<sup>13</sup> and activated macrophages.<sup>14</sup> After binding to the receptor

Received on: February 3, 2012; final version accepted on: December 18, 2012.

From the Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Autónoma University, Madrid, Spain (J.A.M., C.S., J.M.-M., B.M.-G., J.E., J.L.M.-V., L.M.B.-C.); Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain (L.O.); and Biogen Idec, Cambridge, MA (L.C.B.)

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.112.300874/-/DC1>.

Correspondence to Luis M. Blanco-Colio, PhD, Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040-Madrid, Spain. E-mail lblanco@fjd.es

© 2013 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300874

for advanced glycation end products or to toll-like receptor 4, HMGB1 activates vascular endothelial cells and macrophages/monocytes to express proinflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules functioning as a critical mediator of inflammation and promoting tissue repair and regeneration.<sup>15</sup> Different studies have demonstrated that HMGB1 plays a pivotal role in cardiovascular diseases.<sup>16</sup> HMGB1 is expressed in human atherosclerotic plaques.<sup>14</sup> In vitro, HMGB1 increases proliferation and migration of VSMCs and macrophages<sup>17</sup> and induces endothelial cell activation.<sup>18</sup> Finally, it has been recently reported that treatment with an anti-HMGB1 neutralizing antibody diminished atherosclerotic lesion size and inflammation in ApoE knockout mice.<sup>19</sup>

Several cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  or interferon- $\gamma$  can regulate HMGB1 expression and secretion by macrophages.<sup>14</sup> However, the relation between TWEAK and HMGB1 secretion has been minimally analyzed<sup>14</sup> and the in vivo modulation of HMGB1 by TWEAK has not been explored. In the present study, we examined the effect of TWEAK–Fn14 interaction on HMGB1 expression and secretion in cultured monocytes. In addition, we analyzed the association of both proteins with HMGB1 in human carotid atherosclerotic plaques. Furthermore, we have determined the effect of recombinant TWEAK or anti-TWEAK neutralizing antibody treatment on HMGB1 expression in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic ApoE knockout mice.

## Materials and Methods

### Reagents

Roswell Park Memorial Institute medium-1640, penicillin, and streptomycin were obtained from BioWhittaker. Fetal bovine serum was from Gibco. Recombinant soluble human TWEAK (r-HuTWEAK) was from Millipore, and mouse antihuman Fn14 blocking antibody (ITEM-2) was from eBioscience. A blocking murine anti-TWEAK mouse monoclonal antibody (mAb) (clone P2D10) was generated in TWEAK<sup>-/-</sup> mice that cross-reacts with human TWEAK. The generation of mAb- and TWEAK-blocking activity was previously described.<sup>10</sup> This antibody and nonspecific IgG were generously gifted by Biogen Idec. The remaining reagents were obtained from Sigma unless specified otherwise.

### Cell Culture

Human monocytic cell line human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) (ATCC; TIB-202) was cultured in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% de complemented fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. To stimulate HMGB1 expression in THP-1 monocytes, cells were plated at 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL in Roswell Park Memorial Institute medium-1640 supplemented with 0.5% fetal bovine serum. Cells were treated with different concentrations of TWEAK for 24, 48, 72 and 96 hours. To investigate the involvement of various signaling pathways in regulating HMGB1 expression, cells were pretreated for 1 to 2 hours with various protein kinase or nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) inhibitors and then treated with TWEAK for 72 hours. HMGB1 concentration in cell supernatants was then assessed by Western blot analysis.

### RNA Extraction and Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA from THP-1 or aorta from mice was obtained by TRIzol method (Life Technologies) and quantified by absorbance at 260 nm in duplicate. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was

performed on a TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System using heat-activated TaqDNA polymerase (Amplitaq Gold). After an initial hold of 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, the samples were cycled 40 times at 95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds. 18S rRNA served as the housekeeping gene and was amplified in parallel with the genes of interest. The expression of target genes was normalized to housekeeping transcripts. All probes and reagents were obtained from Applied Biosystems. All measurements were performed in duplicate. Values of each sample were obtained as multiples of their baseline values.

### Western Blot

Cells from different experimental conditions were collected and pelleted. Western blots of cellular or supernatant proteins were analyzed as previously described.<sup>20</sup> The blots were incubated with antihuman HMGB1 antibody (Abcam, UK), I $\kappa$ B- $\alpha$  (sc-371, Santa Cruz),  $\beta$ -actin (sc-47778, Santa Cruz), phospho (p)-protein kinase B (AKT) (sc-7985, Santa Cruz), AKT (sc-8312, Santa Cruz), p-(extracellular signal-regulated kinase) ERK (sc-7383, Santa Cruz), and ERK (sc-154, Santa Cruz). Quantification was expressed as arbitrary densitometric units.

### Transfection of Small Interfering RNA

THP-1 cells were transfected with the Cell Line nucleofector Kit V, program V-001 (Amaxa) according to the manufacturer's instructions. The HMGB1 and control small interfering RNA were from Applied Biosystems. Transfections were incubated for 72 hours before adding recombinant TWEAK to obtain maximal transfection efficiency (around 60%).

### Animal Model

Twenty-four ApoE knockout mice (16 weeks of age) were fed on a hyperlipidemic diet (21.2% fat (0.15% cholesterol) + 16.7% proteins) for 10 weeks. After that, animals were randomized into 4 groups: mice injected IP with saline (control group n=6), human recombinant TWEAK (0.01 mg/kg per day, n=6), anti-TWEAK mAb (1 mg/kg per day, n=6), or nonspecific IgG (1 mg/kg per day, n=6) daily for 9 days. The dose of TWEAK was chosen based on earlier in vivo studies<sup>21</sup> and the dose of anti-TWEAK mAb was chosen to be 100-fold in excess of the TWEAK dose. Anesthetized mice were saline perfused. The aortic root was embedded in optimal cutting temperature and frozen for immunohistochemistry. Total aorta was frozen until mRNA was extracted. The study was performed in accordance with the European Union normative and was approved by the ethical committee of our institution. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (publication no. 85–23, revised 1996).

### Patients

Twenty-five patients undergoing carotid endarterectomy at Hospital Galdakao-Usansolo (Spain) with asymptomatic carotid stenosis (>70%) were included in the study (22 men and 3 women, 73 $\pm$ 6 years old, 52% hyperlipidemic, 28% diabetic, 88% hypertensive patients, and 24% smokers). The region of the bifurcation of the common carotid artery was chosen. Atherosclerotic plaques were collected at the time of the surgery and storage in the Biobank of IIS-Fundación Jiménez Díaz. Informed consent was obtained before enrollment in all cases. The study was approved by the hospital's ethics committee (Hospital Galdakao-Usansolo, Spain) according to the institutional and the Good Clinical Practice guidelines. The study was performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and all participants gave written informed consent.

### Immunohistochemistry

Human carotid atherosclerotic plaques were stored in paraformaldehyde for 24 hours and later in ethanol until paraffin embedded. Plaques were cross-sectioned into 5- $\mu$ m-thick pieces, dewaxed



and rehydrated, and incubated overnight with anti-HMGB1 (1:200 dilution; Abcam), anti-TWEAK (1:100 dilution; R&D Systems), anti-Fn14 (1:200 dilution; Cell Signaling Technology), anti-CD68 (1:100 dilution; Dako), anti- $\alpha$ -actin (1:100 dilution; Dako), and anti-CD163 (1:100 dilution; Serotec). Negative controls using the corresponding IgG were included to check for nonspecific staining. Biotinylated secondary antibodies were applied for 1 hour. Then, an avidin–biotin peroxidase complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) was added for 30 minutes. Sections were stained with 3-amino-9-ethylcarbazole (Dako), counterstained with hematoxylin, and mounted in Pertex.

Mice aortic roots were cross-sectioned into 4- $\mu$ m-thick sections. Primary antibody was rabbit anti-HMGB1 (1:200 dilution). Donkey antirabbit biotin was used as secondary antibody and then ABCComplex–horseradish peroxidase was added. The immunohistochemistry sections were stained with 3,3'-diaminobenzidine (Dako), counterstained with hematoxylin, and mounted in Kaisers Glycerin gelatine (Merck).

For immunofluorescence studies, THP-1 cells were plated onto Labtek slides, fixed in 4% paraformaldehyde, and permeabilized in 0.2% Triton X-100/PBS, washed in PBS, and incubated with rabbit anti-HMGB1 (1:100), followed by fluorescein isothiocyanate secondary antibody. Nuclei were counterstained with propidium iodide or 4',6-diamidino-2-phenylindole.

## Quantification

Computer-assisted morphometric analysis with the Olympus semi-automatic image analysis system Micro Image software (version 1.0 for Windows) was performed by a pathologist who was blinded to the group of patients to which the atherosclerotic plaques belonged, as previously described.<sup>5</sup> Results are expressed as per mm<sup>2</sup> for human plaques or per  $\mu$ m<sup>2</sup> for animal plaques.

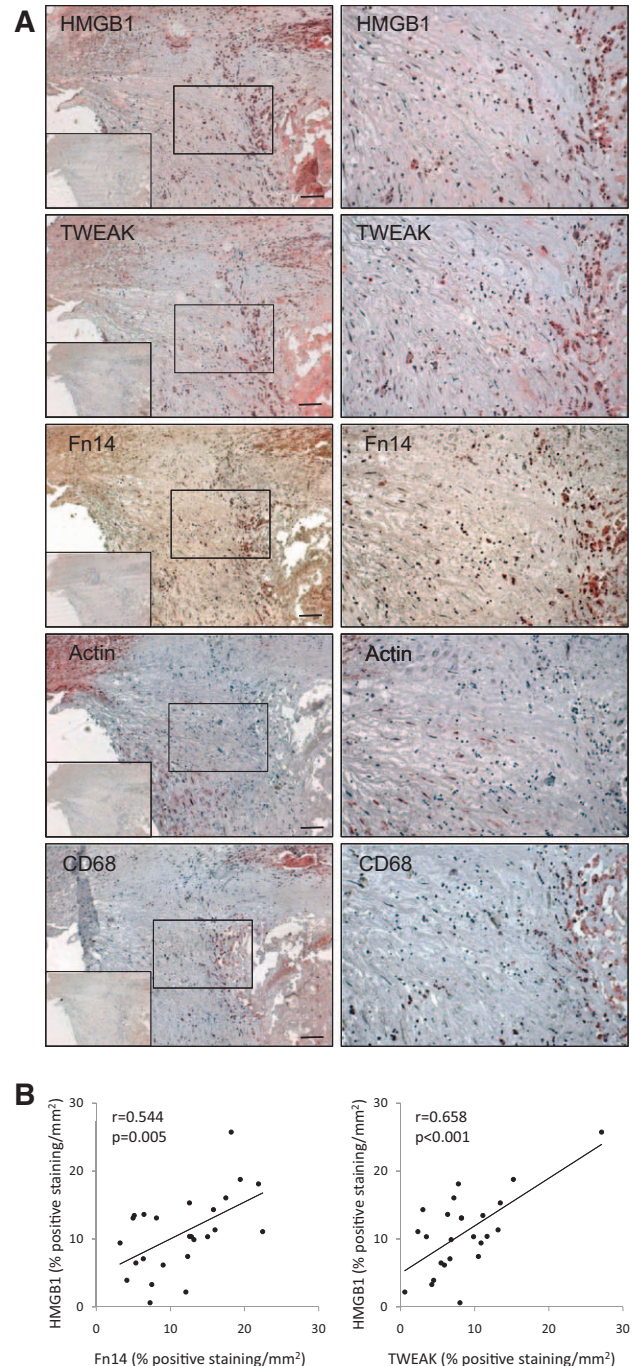
## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 11.0 statistical software. Univariate association was performed by Pearson correlation test. In vitro experiments were replicated at least 3 times. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Significance at the  $P<0.05$  level was assessed by Student  $t$  test for 2 groups of data and ANOVA for 3 or more groups. Differences were considered significant at a value of  $P<0.05$ .

## Results

### Association Among HMGB1, TWEAK, and Fn14 Expression in Human Carotid Atherosclerotic Plaques

We have analyzed the possible relationship among HMGB1, TWEAK, and Fn14 expression in atherosclerotic plaques. TWEAK and Fn14 were highly expressed in positive areas for VSMCs ( $\alpha$ -SM-actin<sup>+</sup>) and macrophages (CD68<sup>+</sup>), whereas HMGB1 was mainly expressed in macrophage-rich areas within human atherosclerotic plaques (Figure 1A). Moreover, analysis of HMGB1, TWEAK, and Fn14 expression in serial sections of atherosclerotic plaques revealed a highly positive linear correlation between HMGB1 and Fn14 expression ( $r=0.616$ ;  $P<0.001$ ) or HMGB1 and TWEAK expression ( $r=0.526$ ;  $P=0.034$ ). These positive associations remain significant when we only consider the shoulder region of atherosclerotic plaques, which is characterized by a high content of infiltrating macrophages (Figure 1B). However, when we analyzed the relationship between these variables in the cap (the rim over the atherosclerotic core), the association was not significant for HMGB1 and Fn14 ( $r=-0.008$ ; not significant), or HMGB1 and TWEAK ( $r=0.089$ ; not significant). Overall, our results could



**Figure 1.** Immunostaining of high-mobility group box 1 (HMGB1), tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (TWEAK), and fibroblast growth factor–inducible 14 (Fn14) in human carotid atherosclerotic plaques. **A**, Representative microphotographies of HMGB1, TWEAK, and Fn14 expression in areas positive for macrophages (CD68<sup>+</sup>) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) ( $\alpha$ -SM-actin<sup>+</sup>), within human carotid atherosclerotic plaque sections. H&E (hematoxylin and eosin staining). Insets represent tissues incubated with nonspecific IgG (control of technique). The rectangle shows the region of interest for which magnification is shown (right). Scale bar, 100  $\mu$ m. **B**, Correlation between HMGB1 and TWEAK or Fn14 in the shoulder region of human atherosclerotic plaques.

indicate that the TWEAK–Fn14 axis could participate in the regulation of HMGB1 expression in the vascular wall.

### TWEAK Increases HMGB1 Expression and Secretion in Cultured THP-1 Monocytes

Because HMGB1 is associated with TWEAK in macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques, we studied whether TWEAK can modulate HMGB1 expression and protein secretion in cultured THP-1 monocytes. For this, THP-1 cells were cultured in the absence or presence of different concentrations of recombinant human TWEAK, and HMGB1 mRNA expression was analyzed. RT-PCR revealed that TWEAK increased HMGB1 mRNA expression in a dose- and time-dependent manner (Figure 2A), peaking at 6 hours. HMGB1 is predominantly expressed in the cell nucleus and, after stimulation of its expression, is released to the cytoplasm and then secreted to the conditioned medium. For this reason, we have analyzed HMGB1 secretion in culture supernatants. TWEAK increased HMGB1 content in the culture medium in a dose- and time-dependent manner over 96 hours (Figure 2B and 2C). Similar results were obtained in cultured human monocytes (Figure I in the online-only Data Supplement).

To determine the implication of the TWEAK receptor, Fn14, in the signaling mechanism underlying HMGB1 induction by TWEAK, we have analyzed the effect of anti-Fn14 blocking antibodies on HMGB1 secretion induced by TWEAK. Preincubation with blocking antibody against Fn14 prevented HMGB1 secretion induced by TWEAK (Figure

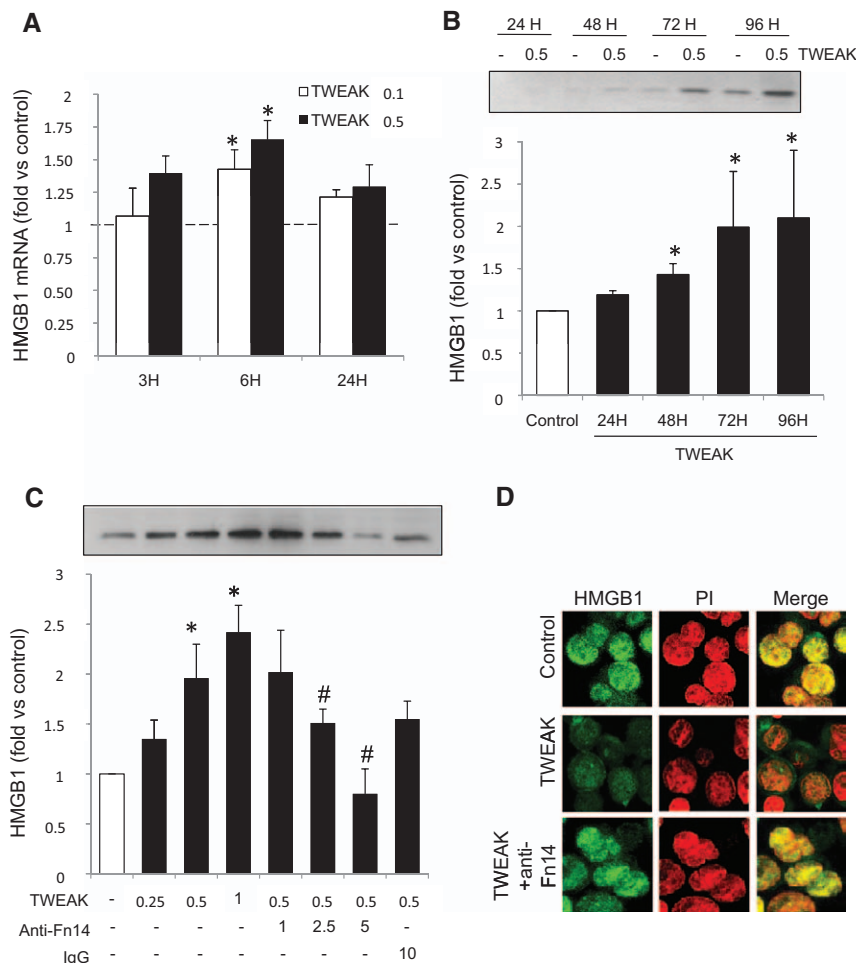
2C). No effect was observed when cells were incubated with nonspecific IgG (Figure 2C).

### Regulation of HMGB1 Cellular Localization by TWEAK

It has been demonstrated that different cytokines can modulate the cellular distribution of HMGB1 in human monocytes.<sup>14</sup> To determine whether TWEAK-induced HMGB1 secretion also affects its cellular distribution, cultured THP-1 cells were immunostained with anti-HMGB1 antibodies and counterstained with propidium iodide. Control cells constitutively expressed HMGB1 mostly localized in the nucleus (Figure 2D). Incubation of THP-1 cells with TWEAK induced a redistribution of HMGB1 from the nucleus to the cytoplasm (Figure 2D). In contrast, pre-treatment of cells with blocking antibody against Fn14 prevented TWEAK-mediated redistribution of HMGB1 in the cells.

### TWEAK-mediated Effects on HMGB1 Expression Are Restricted to Proinflammatory Macrophages In Vitro and in Human Carotid Atherosclerotic Plaques

It has been reported that the polarization of monocytes toward inflammatory (M1) or alternatively activated (M2) macrophages skews the secretion of HMGB1.<sup>22</sup> To determine whether the effects of TWEAK on HMGB1 expression depends on the macrophage subtype, we performed in vitro studies where THP-1 cells were differentiated to M1 or M2 by using phorbol



**Figure 2.** Tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (TWEAK) increases high-mobility group box 1 (HMGB1) mRNA expression and protein secretion in THP-1 cultured monocytes. **A**, Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of HMGB1 mRNA expression in THP-1 treated with different concentrations of recombinant TWEAK. Values for HMGB1 mRNA were normalized to 18S expression, and results are expressed as fold vs control. **B**, Western blot showing the secretion of HMGB1 in THP-1 incubated with recombinant TWEAK (0.5 µg/mL) at different time points. Values are normalized to control in each specific time point and results are expressed as control values. **C**, Western blot showing the secretion of HMGB1 in THP-1 incubated with recombinant TWEAK (0.25–1 µg/mL) alone or in combination with anti-fibroblast growth factor–inducible 14 (Fn14) antibodies (1–5 µg/mL), or nonspecific IgG (10 µg/mL) for 72 hours. **D**, Intracellular distribution of HMGB1 protein. In nonstimulated THP-1 monocytes, HMGB1 (green) is mainly restricted to the nuclei [counterstained by propidium iodide (PI), red] as shown by yellow representing colocalization. THP-1 cells exposed to TWEAK for 2 days contained high amounts of HMGB1 in their cytoplasm with less protein localized in the nuclei. In contrast, THP-1 cells treated with TWEAK and anti-Fn14 showed nuclear HMGB1 distribution.



12-myristate 13-acetate or phorbol 12-myristate 13-acetate plus dexamethasone, respectively.<sup>23</sup> After that, M1 and M2 derived macrophages were stimulated with recombinant TWEAK to analyze HMGB1 mRNA expression. RT-PCR showed that HMGB1 was expressed by both M1 and M2 macrophages. Treatment with recombinant TWEAK increased HMGB1 mRNA expression in M1 macrophages, but not in M2 macrophages (Figure 3A). In the same way, TWEAK increased HMGB1 content in culture supernatant from M1 macrophages, but not from M2 macrophages (Figure 3B), indicating that the effect observed after TWEAK treatment is specific for M1 macrophages.

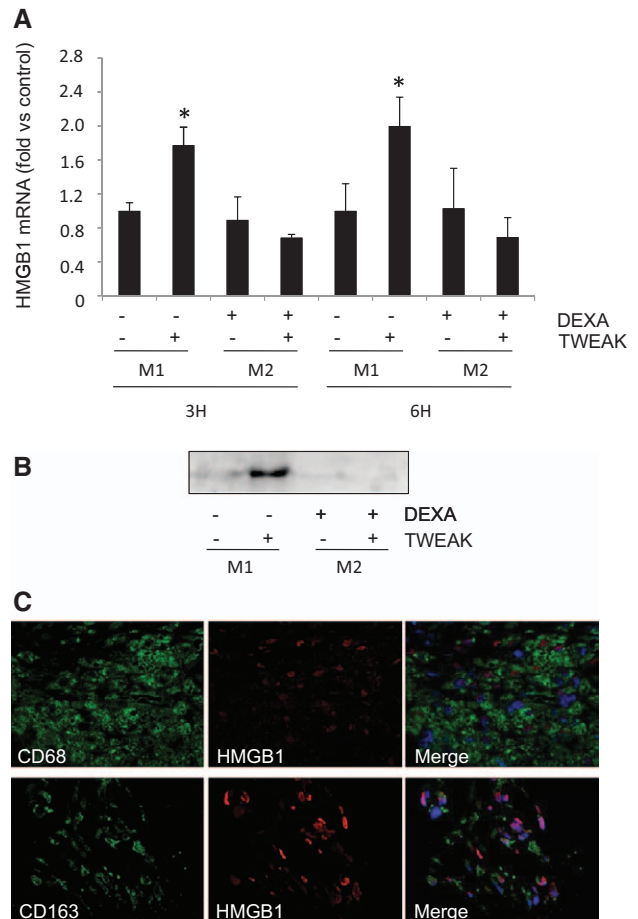
We then analyzed the expression of HMGB1 in human atherosclerotic plaques according to the macrophage subtype. Double immunostaining for HMGB1 and CD68 (a marker expressed in both M1 and M2 macrophages) revealed that in some cells HMGB1 was observed in the nuclei, whereas in other macrophages, no HMGB1 was observed or HMGB1 was not colocalized within the nuclei. Double immunostaining for HMGB1 and CD163 (an M2 marker) showed that HMGB1 remained mainly in the nucleus of M2 macrophages, suggesting that no release of HMGB1 occurred in these anti-inflammatory cells. Overall, these data could indicate that M1 macrophages are responsible for HMGB1 secretion in human atherosclerotic plaques.

### Regulation of TWEAK-Induced HMGB1 Secretion in Monocytes

TWEAK can modulate different signaling pathways, such as ERK1/ERK2, phosphatidylinositol-3 kinase/AKT (PI3K/AKT), and NF- $\kappa$ B, a transcription factor implicated in the regulation of the proinflammatory response.<sup>21,24</sup> We examined whether these kinases and this transcription factor might contribute to the augmented HMGB1 secretion. As shown in Figure 4A, TWEAK increased ERK1/ERK2 and AKT phosphorylation in a time-dependent manner. In addition, TWEAK induced a diminution in I $\kappa$ B protein, indicating an activation of NF- $\kappa$ B. Preexposure to PD98059 (an ERK1/ERK2 inhibitor) did not affect the ability of TWEAK to elevate HMGB1 secretion (Figure 4B). In contrast, wortmannin (an inhibitor of PI3K/AKT pathway) and parthenolide (a NF- $\kappa$ B inhibitor) attenuated the elevation in HMGB1 secretion induced by TWEAK (Figure 4B). To analyze whether PI3K/AKT-mediated effects were independent of the NF- $\kappa$ B effects, we pretreated THP-1 cells with wortmannin and parthenolide alone or in combination, both at higher or lower doses. No additive or synergistic effects on attenuation of the elevation in HMGB1 secretion induced by TWEAK were observed (Figure 4C). Thus, PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B, but not ERK1/ERK2, regulate TWEAK-induced elevations in HMGB1 secretion by monocytes.

### HMGB1 Is Involved in TWEAK-Mediated MCP-1 Release

To analyze whether the increment in HMGB1 expression induced by TWEAK may contribute to the inflammatory response, we first analyzed proinflammatory monocyte chemoattractant protein-1 secretion in supernatants of THP-1 cells that were cultured in the presence or absence of TWEAK. We observed that soluble MCP-1 was augmented in a time- and dose-dependent manner in the culture medium from THP-1 cells after TWEAK treatment

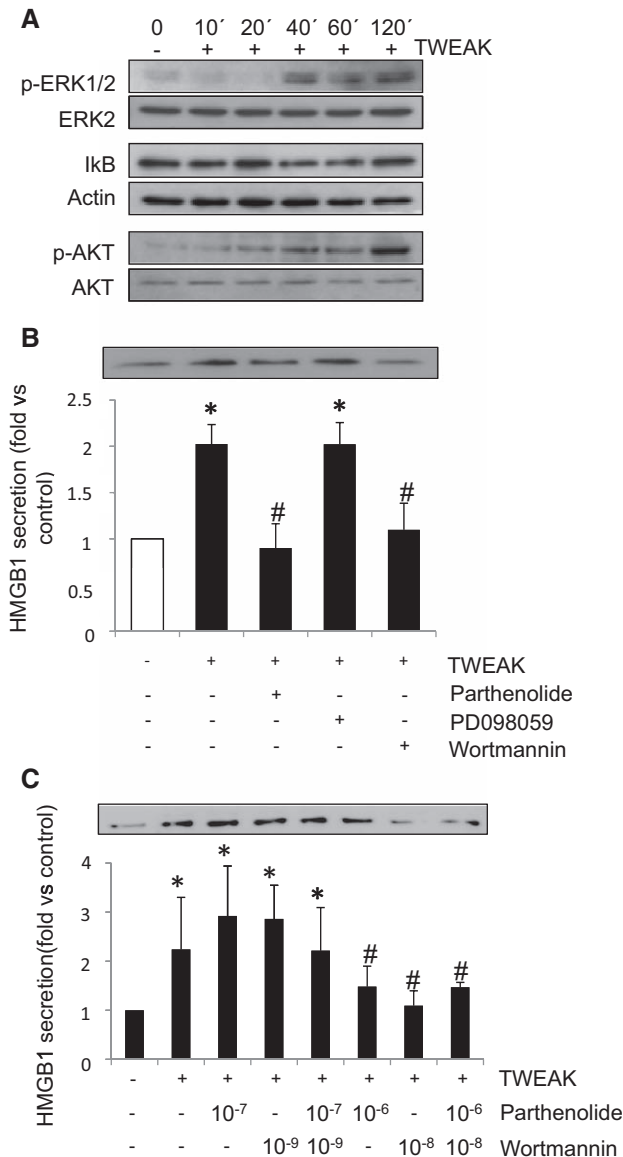


**Figure 3.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-mediated effect on high-mobility group box 1 (HMGB1) expression according to macrophage subtype. THP-1 cells were differentiated into M1 macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate for 48 hours and then were treated with dexamethasone for 24 hours to induce M2 differentiation. After that, M1 and M2 derived macrophages were stimulated with TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL). **A**, HMGB1 mRNA expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **B**, Western blot showing the secretion of HMGB1 in M1 and M2 macrophages incubated with recombinant TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL) for 72 hours. **C**, Representative double immunofluorescence staining showing the expression of CD68 (green, total macrophages), CD163 (green, M2 macrophages), HMGB1 (red), and nuclei stained with DAPI (blue) in the shoulder region of human atherosclerotic plaques.

(Figure 5A and 5B). In these experimental conditions, anti-Fn14 antibody reversed the proinflammatory response induced by TWEAK (Figure 5B). In addition, we analyzed the MCP-1 content in supernatant medium in HMGB1 small interfering RNA-transfected THP-1 cells. Silencing of HMGB1 completely prevented long-term MCP-1 release induced by TWEAK in monocytes (Figure 5C). No effect was observed when cells were incubated with control small interfering RNA (Figure 5B).

### TWEAK Modulates HMGB1 mRNA and Protein Expression in Atherosclerotic Plaques From ApoE Knockout Mice

We have previously demonstrated that systemic TWEAK injection increases inflammation and lesion size in hyperlipidemic



**Figure 4.** Effect of kinases or nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) inhibitors on high-mobility group box 1 (HMGB1) secretion. **A**, Treatment with tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK; 0.5  $\mu$ g/mL) promotes extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and AKT phosphorylation and I $\kappa$ B degradation in monocytes. Cell lysates were analyzed by Western blot for phospho-ERK 1/2, phospho-AKT, or inhibitor of kappa B (I $\kappa$ B). Each blot was stripped and reprobed with anti-ERK, anti-AKT, or  $\beta$ -actin antibody, respectively. **B**, Pretreatment of THP-1 monocytes with parthenolide ( $10^{-6}$  mol/L) and wortmannin ( $10^{-8}$  mol/L), but not PD098059 ( $50 \times 10^{-6}$  mol/L), attenuates HMGB1 secretion induced by 72-hour incubation with TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL). Mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. \* $P$ <0.05 vs control; # $P$ <0.05 vs TWEAK. **C**, Pretreatment of THP-1 cells with wortmannin and parthenolide alone or in combination, both at higher or lower doses, did not show additive or synergistic effects on attenuation of the elevation in HMGB1 secretion induced by 72-hour incubation with TWEAK (0.5  $\mu$ g/mL). Mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. \* $P$ <0.05 vs control; # $P$ <0.05 vs TWEAK.

ApoE knockout mice.<sup>10</sup> Using the same animal model, animals injected with TWEAK showed an increment in HMGB1 expression in atherosclerotic plaques present in the aortic root compared with animals injected with saline (28 $\pm$ 4.9% positive

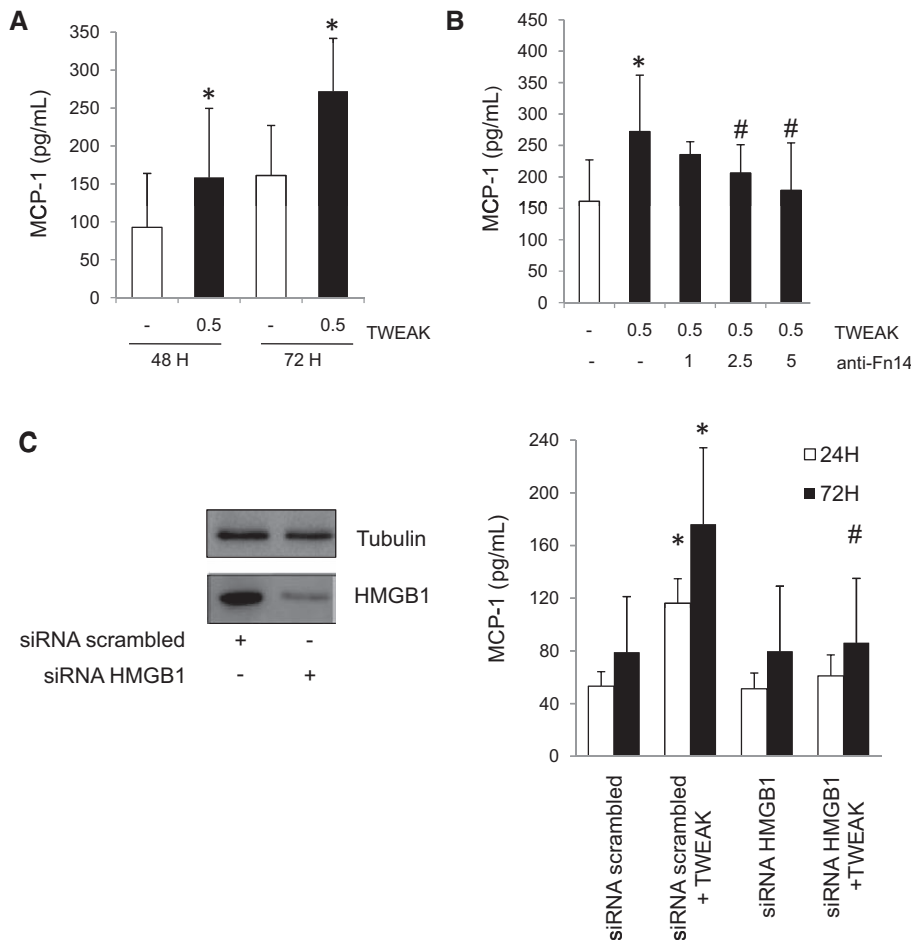
staining of total area versus 16 $\pm$ 2.7%, respectively;  $P$ <0.05; Figure 6A). In addition, mice treated with an anti-TWEAK mAb showed reduced HMGB1 expression compared with control and nonspecific IgG-injected mice [7 $\pm$ 1.2 (anti-TWEAK) versus 16 $\pm$ 2.7 (control); or 14 $\pm$ 1.9 (IgG);  $P$ <0.05]. These results were confirmed by quantitative RT-PCR analysis of HMGB1 mRNA expression from total aorta (Figure 6B). These results suggest that endogenous TWEAK may play a role in HMGB1 expression within the arterial wall in vivo.

## Discussion

In the present work, we have shown that HMGB1 expression is positively associated with Fn14 and TWEAK within human carotid atherosclerotic plaques. Furthermore, TWEAK administration induces HMGB1 expression and secretion in cultured THP-1 monocytes. Finally, systemic injection of recombinant TWEAK augmented HMGB1 expression in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic ApoE<sup>-/-</sup> mice. The involvement of endogenous TWEAK in plaque inflammation was also demonstrated by reduced HMGB1 expression after short-term treatment with anti-TWEAK neutralizing mAb in ApoE<sup>-/-</sup> mice.

The TWEAK–Fn14 axis has been described as a mediator of different processes within the arterial wall. Both are involved in many processes during the development of atherosclerotic plaques, such as proliferation, inflammation, angiogenesis, and apoptosis.<sup>11</sup> Both TWEAK and Fn14 are expressed in human atherosclerotic plaques by VSMCs and macrophages.<sup>5</sup> HMGB1 is also expressed by both cell types,<sup>25</sup> the macrophages being the major source of HMGB1 in human atherosclerotic plaques.<sup>14</sup> Now, we have observed a positive association among HMGB1, TWEAK, and Fn14 expression in the shoulder region of human atherosclerotic plaques, an area characterized by high macrophage content. These data could indicate that TWEAK is implicated in the regulation of HMGB1 within pathological vessel walls. In this respect, we have observed that TWEAK increased HMGB1 expression and secretion in THP-1 cultured monocytes. As reported with other molecules, such as lipopolysaccharide, interferon- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$ ,<sup>14</sup> TWEAK treatment promoted HMGB1 release being apparent after 48 hours of incubation. Interestingly, TWEAK-mediated HMGB1 secretion was related to the presence of Fn14. Thus, use of an anti-Fn14 blocking antibody prevented the increment observed in HMGB1 secretion. These data indicate that the TWEAK–Fn14 axis regulates HMGB1 expression in monocyte/macrophages.

Macrophages comprise heterogeneous cell populations, including inflammatory/M1 and anti-inflammatory/M2 macrophages, which can be identified based on their phenotypic characteristics.<sup>26</sup> Macrophage polarization may vary depending on the nature of the environment.<sup>27</sup> M1 cells infiltrate injured tissues at earlier times after damage, increasing proinflammatory response, whereas M2 macrophages predominate during the resolution phases and show important anti-inflammatory properties.<sup>28</sup> In a previous study, it was reported that polarization of monocytes toward M1 or M2 macrophages skews the secretion of HMGB1.<sup>22</sup> Our data support this observation because TWEAK increased HMGB1 mRNA expression and protein secretion in M1 macrophages, suggesting



**Figure 5.** Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) through high-mobility group box 1 (HMGB1) stimulates MCP-1 secretion in THP-1 monocytes. **A**, Secretion of MCP-1 (at 48 and 72 hours) in THP-1 cells treated with 0.5 μg/mL TWEAK. **B**, Secretion of HMGB1 in THP-1 cells incubated with TWEAK (0.25–1 μg/mL) alone or in combination with anti-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) antibody (1–5 μg/mL) for 72 hours. **C**, Effect of HMGB1 knockdown on TWEAK-induced secretion of MCP-1 in monocyte cells. Western blot showing intracellular expression of HMGB1 in THP-1 cells transfected for 72 hours with siRNA against HMGB1 and scrambled (left) in the presence of recombinant TWEAK (0.5 μg/mL). Cells were harvested for 72 hours posttransfection and stimulated with recombinant TWEAK (0.5 μg/mL) for 24 or 72 hours. Supernatants from THP-1 cells were tested by ELISA for MCP-1 secretion (right). Mean±SD of 3 independent experiments. \* $P<0.05$  vs control; # $P<0.05$  vs TWEAK.

that TWEAK may be involved in the promotion of inflammatory response associated with M1 macrophages throughout HMGB1 release.

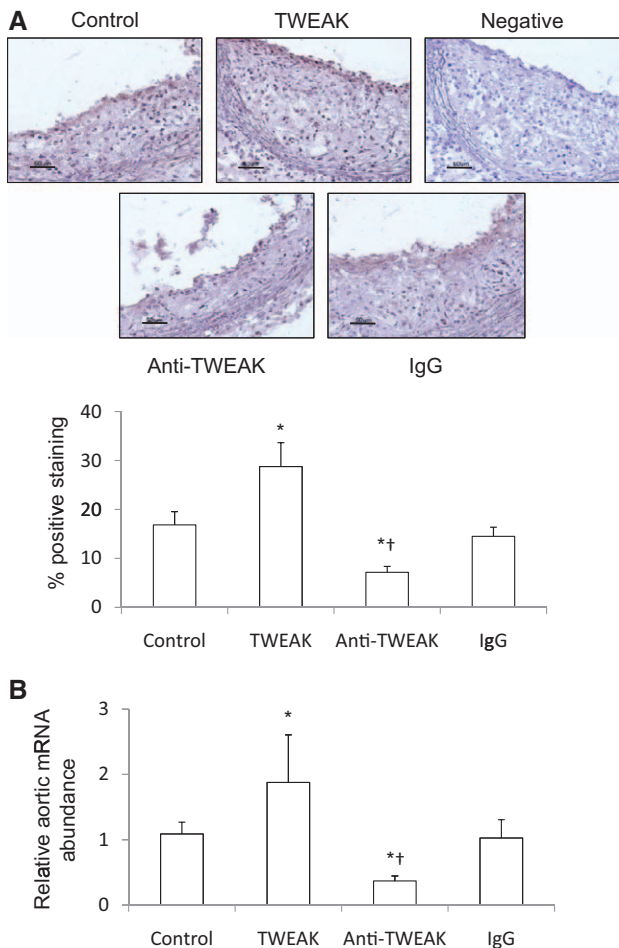
HMGB1 secretion appeared to be associated with both transient elevation in its mRNA levels and translocation from the nucleus to the cytoplasm.<sup>14</sup> In this sense, we have also observed that HMGB1 mRNA upregulation induced by TWEAK was followed by migration of HMGB1 protein from the nucleus to the cytoplasm. In addition, intracellular levels of HMGB1 remained constant (not shown), indicating that release of HMGB1 was accompanied by an augmentation of HMGB1 synthesis.

It is known that HMGB1 expression is regulated by ERK1/2, PKC, and PI3K/Akt.<sup>14</sup> Because TWEAK–Fn14 exerts many of its actions through ERK1/2 or PI3K/Akt,<sup>21</sup> we analyzed the effect of PD098059 (ERK1/2 inhibitor) and wortmannin (PI3K/Akt inhibitor) on HMGB1 secretion induced by TWEAK. Although TWEAK augmented ERK1/2 phosphorylation in THP-1 cells, no effect was observed when PD098059 was added to the culture medium on HMGB1 secretion. In contrast, PI3K inhibitor reduced HMGB1 secretion induced by TWEAK. These data indicate that PI3K, but not ERK1/2, is a specific signal implicated in the control of HMGB1 release induced by TWEAK in monocytes.

In contrast to the effect observed with other cytokines,<sup>14</sup> we have shown that NF-κB is specifically implicated in the regulation of HMGB1 secretion by monocytes. Using an inhibitor

of this transcription factor, parthenolide, HMGB1 secretion induced by TWEAK was diminished. Different studies have demonstrated that the TWEAK–Fn14 axis exerts many of its actions through NF-κB activation in different cell types.<sup>29–31</sup> Moreover, TWEAK increases NF-κB activation in atherosclerotic plaques present in the aortic root of ApoE knockout mice.<sup>10</sup> The finding that NF-κB can regulate HMGB1 release induced by TWEAK is important because secreted HMGB1 may in turn induce NF-κB activation<sup>18</sup> raising the possibility that a loop exists between NF-κB and HMGB1, which prolongs the vascular proinflammatory effects associated with TWEAK.<sup>11</sup> In fact, once released into the intravascular space, HMGB1 could potentially amplify local inflammatory responses by enhancing the release of cytokines and chemokines from monocytes–macrophages.<sup>32</sup> Moreover, HMGB1 interacts with endothelial cells by upregulating surface receptors and inducing the secretion of soluble proinflammatory mediators. HMGB1 also induces the release of a large array of inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-α, MCP-1, and interleukin-6.<sup>18,32</sup> Now, using a HMGB1 small interfering RNA, we have observed that HMGB1 mediates MCP-1 release induced by TWEAK in monocytes/macrophages. These data could demonstrate that HMGB1 is the mediator of the chronic inflammatory response induced by TWEAK. It is important to note that although the TWEAK/Fn14 system appears to induce HMGB1 expression through NF-κB and PI3K/AKT pathways, we could not exclude the





**Figure 6.** Effect of tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and anti-TWEAK mAb on high-mobility group box 1 (HMGB1) mRNA and protein expression in advanced atherosclerotic lesions in ApoE<sup>−/−</sup> mice. Immunostaining of HMGB1 in the aortic root (**A**) and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of HMGB1 mRNA expression in total aorta (**B**) of ApoE<sup>−/−</sup> mice treated with saline (control), TWEAK (0.01 mg/kg per day), anti-TWEAK mAb (1 mg/kg per day), or nonspecific IgG (1 mg/kg per day) daily for 9 days. \* $P < 0.05$  VS control; † $P < 0.05$  VS IgG group. Values shown are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  per group. Negative control was incubated with nonspecific IgG. Scale bar, 50  $\mu$ m.

fact that other pathways may be involved in the regulation of HMGB1 expression by the TWEAK–Fn14 axis. Finally, we have observed that ApoE<sup>−/−</sup> mice injected with recombinant TWEAK showed an increased HMGB1 expression in total aorta and in atherosclerotic plaques present in the aortic root. Moreover, blocking antibodies against TWEAK showed  $\approx 50\%$  reduction in HMGB1 expression in atherosclerotic plaques and total aorta in comparison with control mice, demonstrating that, an anti-TWEAK therapy might be useful to modulate HMGB1 expression in atherosclerotic plaques. However, there are many factors regulating HMGB1; our data also suggest that the remaining HMGB1 expression observed after anti-TWEAK therapy may be induced by other pathway(s) different from the TWEAK–Fn14 axis. Moreover, it has been demonstrated that blocking either TWEAK or HMGB1 by neutralizing antibodies diminishes development of atherosclerosis in ApoE knockout mice.<sup>10,19</sup> In both cases,

neutralizing antibodies decreased proinflammatory cytokine expression and macrophage recruitment in mice atherosclerotic plaques. The similar response observed with both neutralizing antibodies suggests that harmful effects induced by TWEAK may be related, at least in part, to HMGB1.

In conclusion, the present study reveals a novel role of TWEAK in vascular disease, by enhancing HMGB1 expression and participating in the inflammatory response associated with atherosclerotic plaque development.

## Sources of Funding

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (Programa Miguel Servet to JAM and Programa Estabilización Investigadores to L.B.-C.), Fundación Conchita Rábago to C.S., Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (RETICS RD06/0014/0035; RD09/0076/00101; PI10/00234; PI10/00072), Sociedad Española de Arteriosclerosis and Fundación Mútua Madrileña.

## Disclosures

None.

## References

1. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86:515–581.
2. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Carrero JJ, Yilmaz MI, Moreno JA, Gómez-Guerrero C, Ortiz A, Egido J. Vascular proteomics and the discovery process of clinical biomarkers: the case of TWEAK. *Proteomics Clin Appl*. 2011;5:281–288.
3. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:32401–32410.
4. Winkles JA. The TWEAK–Fn14 cytokine–receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:411–425.
5. Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Martínez E, Sánchez S, Hernández G, Ortega L, Ortiz A, Egido J, Blanco-Colio LM. Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke*. 2006;37:2044–2053.
6. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Páramo JA, Michel JB, Ortiz A, Meilhac O, Egido J. Identification of soluble tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:916–922.
7. Harada N, Nakayama M, Nakano H, Fukuchi Y, Yagita H, Okumura K. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299:488–493.
8. Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:8455–8459.
9. Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Martín-Ventura JL, López-Franco O, Sastre C, Ortega L, Burkly LC, Egido J, Blanco-Colio LM. TWEAK–Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2011;89:225–233.
10. Muñoz-García B, Moreno JA, López-Franco O, Sanz AB, Martín-Ventura JL, Blanco J, Jakubowski A, Burkly LC, Ortiz A, Egido J, Blanco-Colio LM. Tumor necrosis factor–like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE–knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2061–2068.
11. Ortiz A, Sanz AB, Muñoz García B, Moreno JA, Sánchez Niño MD, Martín-Ventura JL, Egido J, Blanco-Colio LM. Considering TWEAK as a target for therapy in renal and vascular injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20:251–258.
12. Schapira K, Burkly LC, Zheng TS, Wu P, Groeneweg M, Rousch M, Kockx MM, Daemen MJ, Heeneman S. Fn14–Fc fusion protein regulates



- atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice and inhibits macrophage lipid uptake *in vitro*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2021–2027.
13. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418:191–195.
  14. Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, DiVitto G, Kanellakis P, Kostolias G, Ilyinskaya O, Tararak E, Bobik A. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2320–2325.
  15. Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol*. 2002;72:1084–1091.
  16. Li W, Sama AE, Wang H. Role of HMGB1 in cardiovascular diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:130–135.
  17. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, Maseri A, Bianchi ME. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J*. 2006;20:2565–2566.
  18. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003;101:2652–2660.
  19. Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Peter K, Nishibori M, Bobik A. High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:313–319.
  20. Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Lorz C, Díaz C, Hernández G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors decrease Fas ligand expression and cytotoxicity in activated human T lymphocytes. *Circulation*. 2003;108:1506–1513.
  21. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3329–3342.
  22. Lolmede K, Campana L, Vezzoli M, Bosurgi L, Tonlorenzi R, Clementi E, Bianchi ME, Cossu G, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol*. 2009;85:779–787.
  23. Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Páramo JA, Ortega L, Egido J, Blanco-Colio LM. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;207:103–110.
  24. Roos C, Wicovsky A, Müller N, Salzmann S, Rosenthal T, Kalthoff H, Trauzold A, Seher A, Henkler F, Kneitz C, Wajant H. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2010;185:1593–1605.
  25. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Maruyama I. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol*. 2007;16:136–143.
  26. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953–964.
  27. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453–461.
  28. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:958–969.
  29. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:695–703.
  30. Li H, Mittal A, Paul PK, Kumar M, Srivastava DS, Tyagi SC, Kumar A. Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappaB-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: a potential role of MMP-9 in myopathy. *J Biol Chem*. 2009;284:4439–4450.
  31. Dogra C, Changotra H, Mohan S, Kumar A. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor-kappaB and degradation of MyoD protein. *J Biol Chem*. 2006;281:10327–10336.
  32. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*. 2000;192:565–570.

## **Supplemental Methods**

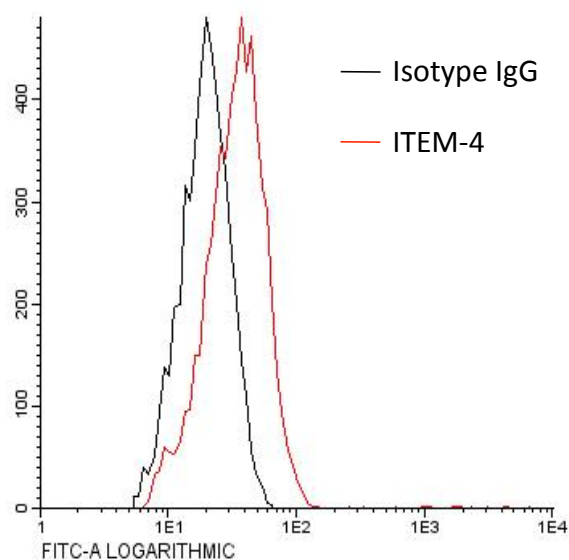
### **Isolation of human monocytes**

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats from healthy donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) gradient according to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14<sup>+</sup> microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes ( $0.5 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in RPMI supplemented with 5% FBS for 3 days in absence or presence of recombinant TWEAK (0-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ).

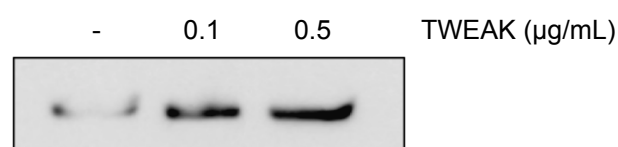
### **Flow cytometry**

To analyze Fn14 cell surface expression, flow cytometric analysis of CD14<sup>+</sup> cells isolated from Buffy Coats was conducted. Briefly, CD14<sup>+</sup> cells isolated from Buffy Coats were incubated for 30 min hour on ice with anti-Fn14 antibody (ITEM-4, eBioscience, 1  $\mu\text{g/mL}$ ), or an isotype-matched control antibody. Cells were then washed twice with 0.2% BSA in PBS and incubated with Alexa488-labeled goat anti-mouse IgG antibody (1/300, Invitrogen) for 45 minutes on ice. Following 2 washes, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer using BD CellQuest software (BD Biosciences).

A



B



### Supplemental Figure I: TWEAK increases HMGB1 secretion in human monocytes.

A) Flow cytometry analysis of Fn14 expression in human monocytes (CD14<sup>+</sup> cells) after 3 days of incubation.

B) Western blot showing the secretion of HMGB1 in human monocytes in the presence of absence of recombinant TWEAK (0-0.5 µg/mL) for 72 h.